

**Die Regulation der humanen
B-Zelldifferenzierung in vitro
und ihre Beeinflussung
durch lösliche Faktoren**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

BERTHOLD SZPERALSKI

aus Lübeck

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546407_0002

**Die Regulation der humanen
B-Zelldifferenzierung in vitro
und ihre Beeinflussung
durch lösliche Faktoren**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

BERTHOLD SZPERALSKI

aus Lübeck

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1984

Referent: Prof.Dr.W.König

Korreferent: Prof.Dr.R.Berzborn

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der
Ruhr-Universität Bochum (Direktor: Prof. Dr.
W. Opferkuch) in der Arbeitsgruppe für Infekt-
abwehrmechanismen unter der Leitung von Prof. Dr.
W. König angefertigt.

Ich danke Prof. Dr. W. König, der mir diese Arbeit
durch ständige Unterstützung ermöglicht hat.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts
für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie für
die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt den zahlreichen Blutspendern,
ohne deren Bereitschaft diese Arbeit nicht möglich ge-
wesen wäre.

<u>Abkürzungen</u>	Seite
	1
<u>1. Einleitung</u>	3
1.1. Bedeutung und Funktion der B-Zell-differenzierung	6
1.2. Genetische Voraussetzungen für die Ontogenese der B-Zellen	7
1.3. Regulation der B-Zellentwicklung durch T-Zellen	11
1.4. Die Bedeutung der Aktivierung von B-Zellen	17
1.5. Die Differenzierung zu Plasmazellen	20
1.6. Die Ausbildung einer IgE-Antwort	22
1.7. Das PWM-Aktivierungsmodell im humanen System	26
1.8. Fragestellung	31
<u>2. Material und Methoden</u>	34
2.1. Verbrauchsmaterial	34
2.2. Medien und Lösungen	35
2.3. Methoden	41
2.3.1. Markierung von Antikörpern mit J125	41
2.3.2. Durchführung des Radioimmunoassays (RIA)	41
2.3.3. Berechnung der RIA-Eichkurve	43
2.3.4. Isolierung von peripheren Blut-lymphozyten (PBL)	47
2.3.5. Kultivierung der peripheren Blut-lymphozyten	47
2.3.5.1. Messung der Immunglobulinproduktion	47
2.3.5.2. Messung des Thymidineinbaus	48
2.3.6. Auftrennung von B- und T-Zellen	49
2.3.6.1. Vorbehandlung der Schaferythrozyten für die Rosettierung von T-Zellen	49
2.3.6.2. Rosettierung von T-Zellen	49
2.3.6.3. Depletion der Rosetten-bildenden T-Zellen	50

	Seite
2.3.7. Produktion Lymphokin-haltiger PBL-Überstände	51
2.3.7.1. ConA-Sepharose induzierte PBL-Überstände	51
2.3.7.2. PWM-induzierte PBL-Überstände	51
2.3.8. Fixierung von ConA-Sepharose mit Glutaraldehyd	51
2.3.9. Messung der TCGF-Aktivität	52
2.3.9.1. Kultivierung von TCGF-abhängigen T-Zellen	52
2.3.9.2. Isolierung von T-Zellblasten	53
2.3.9.3. Testansatz für die TCGF-Messung	53
2.3.10. Messung von B-Zellfaktoren	55
2.3.10.1. Präparation des B-Zellaktivators SAC	55
2.3.10.2. Aktivierung der B-Zellen	56
2.3.10.3. Isolierung der B-Zellblasten	56
2.3.10.4. Messung des Faktor-abhängigen Thymidineinbaus (BCGF-Messung)	56
3. <u>Resultate</u>	58
3.1. Spezifität des Radioimmunoassays	58
3.1.1. Die Meßgrenze und Genauigkeit des RIAs	59
3.2. Die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion	63
3.2.1. Zeitkinetik	63
3.2.2. Einfluß der Zelldichte auf die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion	66
3.2.3. Die Abhängigkeit des PWM-Optimums von der Zelldichte	68
3.2.4. Die Abhängigkeit der spontanen Immunglobulinproduktion von der Zelldichte und der Kulturdauer	73
3.2.5. Messung der Immunglobulinproduktion von PBL-Kulturen, die mit PWM voraktiviert wurden	76

	Seite
3.3. Weitere Versuche einer IgE-Stimulation	81
3.3.1. Der Einfluß von Propranolol auf die PBL-Kultur	81
3.3.2. Der Einfluß von PMA auf die Ig-Produktion	84
3.4. Die Immunglobulinproduktion von PWM-aktivierten PBL-Kulturen allergischer Spender	86
3.4.1. PWM-induzierte IgM-Produktion	88
3.4.2. PWM-induzierte IgG-Produktion	88
3.4.3. IgE-Produktion	90
3.4.4. Spontane Ig-Produktion	93
3.5. Aktivität der Überstände von ConA-Seph-rose aktivierten PBL (CASS)	95
3.5.1. Zeitkinetik	97
3.5.2. Dosisabhängigkeit der CASS-Aktivität	97
3.5.3. PWM-Kinetik	99
3.5.4. Spenderspezifische Einflüsse auf die Inhibition	99
3.5.5. Einfluß von CASS auf den Thymidineinbau transformierter PBL-Kulturen	104
3.5.6. Vergleich der Wirkung von CASS und ConA auf die PWM-induzierte Ig-Produktion	106
3.5.7. Wirkung von CASS auf PWM-voraktivierte PBL	108
3.5.8. Wirkung der CASS-Überstände auf die IgE-Produktion einer Myeloma Zelllinie "U-266"	111
3.5.9. Einfluß der Fixierung von ConA-Seph-rose	111
3.6. Messung der TCGF-Aktivität von CASS	113
3.7. Messung von B-Zellfaktoren	117
3.7.1. Optimierung der Proliferationsmessung	117
3.7.2. Messung der Immunglobulinproduktion	120
3.7.3. Einfluß der Zelldichte	125
3.7.4. Vergleich von CASS und PWM-Sup	127

	Seite
3.7.5. Einfluß von CASS auf die durch Faktoren aktivierte B-Zellproliferation und Ig-Produktion	131
3.7.6. Einfluß der Dialyse auf die Helferaktivität der verwendeten Überstände CASS und PWM-Sup	133
4. <u>Diskussion</u>	136
4.1. Messung der Immunglobulinklassen im RIA	136
4.1.1. Die Empfindlichkeit des RIA	136
4.1.2. Die Spezifität des IgE-RIA	137
4.2. Bedingungen für die PWM-stimulierte Ig-Produktion	139
4.2.1. Optimale PWM-Konzentrationen	140
4.2.2. Einfluß der Zelldichte	141
4.2.3. Schlußfolgerung	143
4.3. Suppressionsmechanismen in der PWM-induzierten Ig-Produktion	143
4.3.1. Die PWM-vermittelte Suppression	143
4.3.2. Die Wirkung von ConA-Sepharose-induzierten Suppressorfaktoren in der PWM-Kultur	146
4.3.3. Mechanismen für die mögliche Wirkung von CASS in der Suppressionskaskade	149
4.3.3.1. Die Beteiligung von TCGF an der Suppressionskaskade	151
4.3.3.2. Aktivierung von Suppressor Inducer Zellen	154
4.3.3.3. Aktivierung von Suppressor Vorläufer Zellen	156
4.3.3.4. NK-Zellen als Suppressorzellen	158
4.4. Die Immunglobulin E Produktion in vitro	159
4.4.1. Das Ausbleiben der Stimulation als Funktion von Suppressorzellen	161
4.4.2. Die möglichen Gründe für die Schwierigkeit, eine Stimulation der IgE-Produktion nachzuweisen	162
4.4.3. Schlußfolgerung	166

	Seite
4.5. Bestimmung der Helferaktivitäten in isolierten B-Zellkulturen	166
4.5.1. Das Meßsystem	166
4.5.2. Isotypenspezifische Effekte	171
4.5.3. Die Wirkung von CASS	172
4.5.4. Dialysierte Helferfaktoren	173
4.5.5. Schlußfolgerung	174
5. <u>Zusammenfassung</u>	175
6. <u>Literatur</u>	178
Addendum	203

Abkürzungen

AET	Aminoethylisothiuroniumbromid
BBS	Borate Buffered Saline
BCDF	B-Cell Differentiation Factor
BCGF	B-Cell Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CASS	ConA-Sepharose induced Supernatant
C _H	Gen für den konstanten Teil der schweren Ig-Kette
Ci	Curie
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
D	Diversity (Gensegment für den variablen Teil der schweren Ig-Kette)
DNA	Desoxyribonucleic Acid
F(ab)	Antigen-bindender Teil des Immunglobulins
FCS	Fetal Calf Serum
g	Erdbeschleunigung
HLA	Human Leucocyte Antigen
Ia	Immuneresponse region associated antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
cIg	cytoplasmatisches Ig
mIg	membrangebundenes Ig
Il-1	Interleukin 1
Il-2	Interleukin 2 (entspricht TCGF)
J	Joining (Gensegment für die variablen Abschnitte der Immunglobulinketten)
JRA	Juvenile Rheumatoide Arthritis
KHF	Killer Helper Factor
MG	Molekülgewicht
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
N.b.	Nippostrongylus brasiliensis
NK	Natural Killer

PHA	Phytohämagglutinin
PPP	Pyrophosphat Puffer
PWM	Pokeweed Mitogen
PWM-Sup	PWM induced Supernatant
RNA	Ribonucleic Acid
pRNA	primäre RNA
SAC	Staphylococcus aureus Cowan I
SE	Suppressor Effektor
SI	Suppressor Inducer
SIF	Suppressor Inducer Factor
SV	Suppressor Vorläufer
TCGF	T-Cell Growth Factor
UPM	Umdrehungen pro Minute
V	Variance (Gensegment für den variablen Abschnitt der Immunglobulinkette)

1. Einleitung

Das Immunsystem der Wirbeltiere umfaßt eine Vielzahl von zellulären, molekularen und genetischen Komponenten, deren Zusammenspiel sowohl für die spezifische als auch für die unspezifische Abwehrleistung verantwortlich ist. Die zellulären Träger der Immunantwort gliedern sich ebenfalls in spezifische und unspezifische Anteile. Auf der unspezifischen Seite stehen die Makrophagen/Monozyten und Granulozyten, die beim Erstkontakt mit dem Fremdartigen eine wichtige Rolle spielen. Hinsichtlich der spezifischen Immunantwort haben die Makrophagen zusätzlich eine Antigen-präsentierende Funktion, durch die das Antigen in einer konzentrierten Form für die Aktivierung von T-Lymphozyten bereitgestellt wird. Die Lymphozyten sind die spezifischen Komponenten des zellulären Immunsystems. Die klassische Einteilung unterscheidet 1. Antikörper-produzierende B-Zellen und 2. T-Zellen mit ihren zytotoxischen Eigenschaften. In beiden Fällen wird die Antigenspezifität durch klonal restringierte Rezeptoren ermöglicht, die durch genetische Rekombination festgelegt sind. Diese Antigen erkennenden Rezeptoren sind für die antigenspezifische Expansion der relevanten Zellklone von großer Bedeutung. Membrangebundene Immunglobuline sind für die antigenspezifische B-Zellantwort verantwortlich. Erst in der sezernierten Form vermitteln die humoralen Immunglobuline die bekannten Antigen-Antikörperreaktionen im Plasma.

Von diesem grundlegenden Konzept einer Immunantwort ausgehend, entwickelt sich eine Vielzahl von modellhaften Vorstellungen über die Regulation der Immunantwort. Die klassische Einteilung in B- und T-Zellen wird erweitert durch die Vorstellung, daß die Funktion der T-Zellen nicht nur auf die zytotoxische Wirkung beschränkt ist, sondern auch regulatorische Aufgaben beinhaltet.

Es entsteht das Konzept der regulatorischen Mechanismen, die einerseits die Immunantwort fördern, andererseits Überreaktionen verhindern. Die einzelnen Komponenten des Immunsystems können nicht isoliert voneinander ihre Entwicklungen durchschreiten. Im einzelnen bedeutet es, B-Zellen sind auf zelluläre Kontakte mit T-Zellen angewiesen, sie benötigen außerdem Mediatoren aus den T-Zellen für die Differenzierung zu Plasmazellen.

Die Analyse der verschiedenen Interaktionen im Immunsystem ergibt das Bild eines fein verwobenen Netzwerkes. Die Entwicklungen auf dem Gebiet der zellulären Immunbiologie haben in den letzten Jahren das Verständnis für die Homöostase des Immunsystems im Wirbeltier stark erweitert. Besonders die Einführung von Kulturtechniken hat den Zugang auch der humanen Immunbiologie zu Gebieten eröffnet, die vorher nur der Tierimmunologie vorbehalten waren.

Die Konzepte der humoralen Immunität auf der einen Seite und der zellulären Immunität auf der anderen Seite konnten zunächst nur in tierexperimentellen Arbeiten untersucht werden. Die enge Verknüpfung von B- und T-Zellen in der Immunantwort ließ sich lange Zeit nur in vivo nachweisen. Trotzdem waren diese Experimente die Voraussetzung für die anschließenden Charakterisierungen der morphologisch einheitlich erscheinenden Lymphozyten. Schritt für Schritt konnten die immunologischen Phänomene aus dem lebenden Organismus in Kultursysteme übertragen werden. Hier wurden definierte Bedingungen geschaffen, die es erlaubten, die Mechanismen der Immunantwort mitsamt ihrer Regulation besser zu verstehen. Die so entwickelten Techniken kamen zunehmend auch der humanen Immunbiologie zugute. Es wurde erkannt, daß nicht nur die Träger der immunologischen Spezifität, die B-Zellen und die zytotoxischen T-Zellen, die Immunantwort ermöglichen. Eine entscheidende Aufgabe kam auch den regulatorischen T-Zellen sowie den Makrophagen/Monozyten zu. Die Regulation konnte

sich sowohl in Form von "Hilfe" oder "Suppression" bemerkbar machen. Die Analyse der dafür verantwortlichen Zellpopulationen wurde durch die Einführung der Hybridomatechnik erweitert. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern erleichterte es, Oberflächenmarker der regulatorischen T-Zellen zu definieren. Die physikalische Auftrennung der Subpopulationen wurde durch diese Antikörper möglich. Methoden wie "Panning" (antikörperspezifische Adhärenz an Plastikoberflächen) oder "Cell-Sorting" (elektronische Auftrennung von Immunfluoreszenz-markierten Zellen mit Hilfe eines Laserstrahls) etc. konnten etabliert werden.

Lymphozytenkulturen eröffneten andererseits auch die Möglichkeit, lymphozytäre Mediatoren (Lymphokine), die zum größten Teil aus den regulatorischen T-Zellen stammten, zu analysieren. Die Untersuchungen dieser hormonartigen Botenstoffe führten zu dem Konzept, daß die Partner der immunologischen Reaktion durch zahlreiche Interaktionen sowohl auf der Ebene des Zellkontakts als auch hinsichtlich löslicher Mediatoren miteinander verbunden sind. Das Gebiet der löslichen Mediatoren war lange Zeit schwierig zu bearbeiten, da es nur unter großem Aufwand möglich war, biochemisch einheitliche Faktoren zu gewinnen. Hier konnte die Einführung von klonierten T-Zelllinien die Voraussetzung für monoklonale Lymphokine bieten. Klonierte T-Zelllinien konnten auf der einen Seite durch die Hybridomatechnik, auf der anderen Seite durch neue Kultivierungstechniken mit dem Wachstumsfaktor "T-Cell Growth Factor" (TCGF) etabliert werden. Die oben erwähnten Fortschritte erlauben es, auch auf dem Gebiet der humanen Immunbiologie zunehmend Erkenntnisse zu gewinnen. Diese Grundlagen sind von großem Interesse. Sowohl die medizinische als auch die biologische Forschung kann in dieser Hinsicht profitieren.

1.1. Bedeutung und Funktion der B-Zelldifferenzierung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Differenzierung von humanen B-Zellen. B-Zellen sind die Vorläuferzellen von Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen. Sie sind für die Entwicklung einer humoralen Immunantwort verantwortlich. Durch die Bildung von antigenspezifischen Antikörpern haben sie einen großen Anteil an der Immunität eines Wirbeltierorganismus. Die Produkte der B-Zellen, die Immunglobuline, bewirken auf zwei Ebenen eine spezifische Immunreaktion:

1. Die antigenspezifische Reaktion ist im F(ab)-Teil der Immunglobuline lokalisiert. Hypervariable Aminosäuresequenzen in diesem Abschnitt deuten auf die Vielfalt der verschiedenen Antigenspezifitäten hin. Die hohe Variabilität im F(ab)-Teil wird durch Rekombination von Gensegmenten aus 2 bzw. 3 verschiedenen Genpools ermöglicht. Durch diese Rekombination während der frühen B-Zellreifung ist jeder B-Zellklon auf eine Aminosäuresequenz des F(ab)-Abschnittes bzw. auf einen Idiotyp festgelegt.
2. Die Effektorspezifität der Immunglobuline ist im Fc-Abschnitt begründet. Die verschiedenen Immunglobulinklassen und -subklassen (Isotypen) sind entscheidend für die Art der Reaktion, die ein Antigen-Antikörperkomplex auslösen kann.

Die Aufgaben der B-Zellen bei einer Immunantwort liegen darin, Antigene zu erkennen, eine antigenspezifische Erkennung in eine klonale Expansion von spezifischen B-Zellen umzusetzen und die Induktion zu isotypenspezifischen Plasmazellen zu ermöglichen. Die Ausbildung der verschiedenen Immunglobulinklassen soll im Idealfall eine optimale Effektorwirkung der Antikörper gegen das Antigen gestalten. Die genannten Differenzierungsschritte unterliegen komplizierten Regulationsmechanismen, die auf der einen Seite den Ablauf der Immunreaktion unterstützen, auf der anderen Seite aber dafür Sorge

tragen, daß die Reaktion nicht überschießt. Die Regulation ist für die Homöostase des Immunsystems von großer Bedeutung. Viele Erkrankungen des Immunsystems können auf Störungen dieser Regulation zurückgeführt werden. Beispiele dafür sind Immundefizienzen, Autoimmunerkrankungen, allergische Erkrankungen etc.

Die Untersuchung zu den Regulationsmechanismen der B-Zelldifferenzierung ist jedoch nicht nur für die klinische Immunpathologie von großer Bedeutung. Die Differenzierung und Regulation von B-Zellen beinhaltet auch Aspekte von allgemeinbiologischem Interesse, wie z. B.: die Entwicklung spezialisierter Zellen, differentielle Genaktivierung, Zellkommunikation und -interaktion, Wachstum und Differenzierung von Zellen. Für diese zellbiologischen Prozesse bietet das Immunsystem und speziell die Differenzierung der B-Zelle ein ideales Untersuchungsgebiet.

1.2. Genetische Voraussetzungen für die Ontogenese der B-Zellen

Die genetische Information für die Ausbildung von Immunglobulinen muß einerseits eine große Variabilität der F(ab)-Teile (Idiotypen) der verschiedenen B-Zellklone und andererseits das Umschalten (den "Switch") der Immunglobulinklassen während der späten B-Zelldifferenzierung gewährleisten. Die genetische Information für den F(ab)-Teil wird relativ früh in der Embryonalentwicklung bei der B-Zellreifung in den Bursa-Äquivalenten für jeden B-Zellklon festgelegt. Die große Variabilität der Idiotypen kommt durch die Kombinationsvielfalt von einzelnen Gensegmenten zustande. Die genetische Information für die F(ab)-Teile der leichten Immunglobulinketten wird durch die Rekombination eines V_L -Gens mit einem J_L -Gen ermöglicht. In der embryonalen Maus existieren etwa 150 verschiedene V_L -Gene und 5 J_L -Gene (Leder, 1982), so daß sich rechnerisch 750 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für eine aktive V_L/J_L -Rekombination ergeben.

Abb. 1:

Organisation der Gene für die schwere Immunglobulinkette

in der embryonalen Zelle



V/D/J-Rekombination

in der prä-B-Zelle



VDJ/C_H-Rekombination

in der differenzierten Plasmazelle

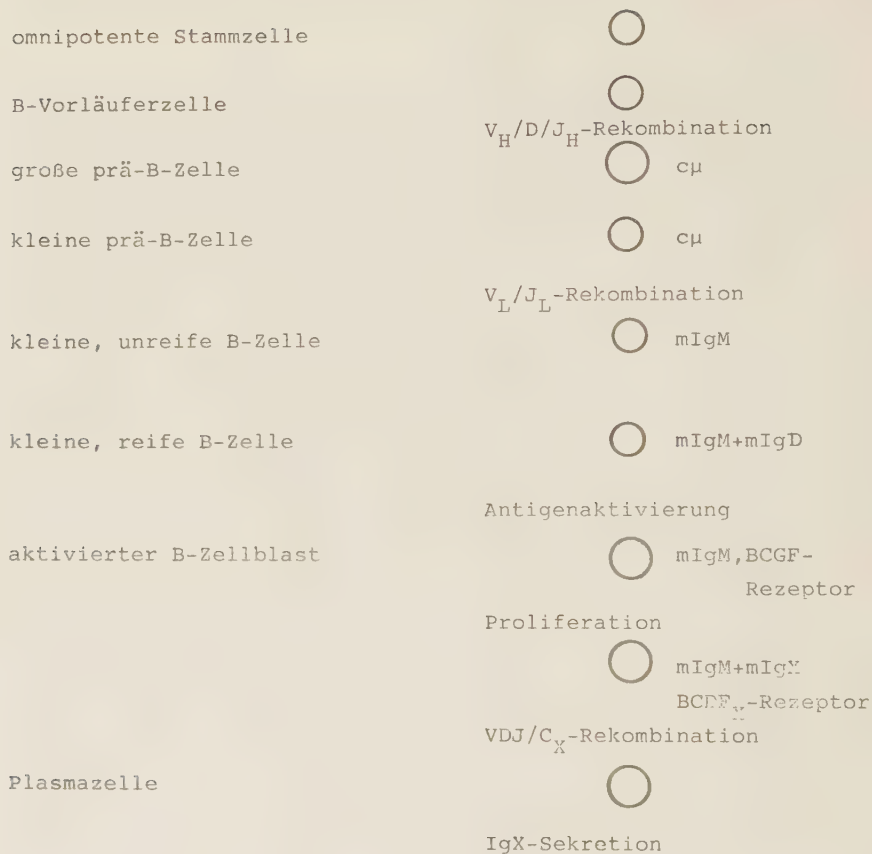


Bei den schweren Immunglobulinketten wird die Information für den F(ab)-Teil durch Rekombination von drei verschiedenen Genklassen ermöglicht (s. Abb. 1). In embryonalen Mauszellen existieren 80 V_H -Gene, 6 D-Gene und 50 J_H -Gene. Es errechnen sich 2400 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Sowohl bei den schweren als auch bei den leichten Ketten wird die große Diversität durch eine gewisse Flexibilität im Rekombinationsprozeß sowie durch somatische Punktmutationen erhöht. Die Kombination einer schweren und einer leichten Immunglobulinkette vervielfacht die Variationsmöglichkeiten für ein komplettes Immunglobulin. Leder (1982) schätzt die Zahl der verschiedenen Antikörpermoleküle bzw. möglichen B-Zellklone auf 18 Milliarden. Diese hohe Zahl wird durch die Rekombination von nur 300 verschiedenen Gensegmenten ermöglicht.

Das komplette, aktive Immunglobulin-Gen entsteht durch Rekombination des $V_H/D/J_H$ - bzw. V_L/J_L -Gens mit den Gensegmenten für die konstanten Teile der Immunglobulinketten. Im Fall der schweren Kette verbindet sich das individuelle V/D/J-Gen zunächst mit dem C μ -Gen. Die ersten Zellen, die aufgrund von cytoplasmatischen μ -Ketten als B-Zellen angesprochen werden können, sind große prä-B-Zellen (s. Abb. 2). Sie können am 16. Schwangerschaftstag bei der Maus und am 49. Tag beim Menschen in der fötalen Leber entdeckt werden (Gathings 1977). Nach der Ausbildung von leichten Ketten kann das komplette IgM Monomer auf der B-Zellmembran nachgewiesen werden. Die undifferenzierten B-Zellen tragen auf ihren Chromosomen noch die komplette Information für alle Immunglobulinklassen. Die Anordnung der entsprechenden C $_H$ -Gene ist in der Abb. 1 für den Menschen dargestellt.

Die Expression des membrangebundenen IgM wird auf der Ebene der primären RNA beim Processing reguliert. Die genetische Information für die anderen, nicht exprimierten Isotypen wird von der primären RNA durch Splicing entfernt. Auch in

Abb. 2: Ontogenese der B-Zellen



diesem Stadium enthält die Zelle auf der DNA noch die komplette Information für alle Immunglobulinklassen (Yaoita, 1982). Das Erscheinen der verschiedenen Immunglobulinklassen auf der B-Zellmembran wird ebenfalls beim Processing der pRNA reguliert. Zunächst tritt neben IgM das IgD auf der B-Zellmembran auf. IgD scheint eine gewisse Bereitschaft zu signalisieren, die für die Aktivierung und Induktion zur Proliferation der B-Zellen notwendig ist (Kuritani, 1982). Später treten neben IgM auch die anderen Immunglobulinklassen auf der B-Zellmembran auf. Über die Regulation für das Auftreten der anderen Isotypen herrscht noch eine große Wissenslücke. Bestimmte isotypenspezifische Phänomene, die bei unterschiedlichen Immunisierungsparametern, wie die Art des Antigens, die Antigendosis, der Einsatz von Adjuvantien, die Immunisierungsroute etc. Einfluß nehmen, lassen darauf schließen, daß die Expression membrangebundener Immunglobuline von extrazellulären Faktoren gesteuert werden kann. Welche Regulationsmechanismen den Switch der membrangebundenen IgG, IgA oder IgE beeinflussen, ist ein ungelöstes Problem.

Durch die Rekombination von $V_H/D/J_H$ -Genen mit anderen C_H -Genen als C_μ bzw. C_δ wird in der letzten Differenzierungsphase der B-Zellentwicklung der Isotyp der späteren Plasmazelle festgelegt. Die genetische Information für die anderen Isotypen auf der DNA geht verloren. Dieser Differenzierungsprozeß scheint durch isotypenspezifische T-Helferzellen und ihre Faktoren reguliert zu werden.

1.3. Regulation der B-Zellentwicklung durch T-Zellen

Mit der Entdeckung der Bursa Fabricius als Reifungsort der B-Zellen bei Vögeln (Glick, 1956) und dem Thymus als Reifungsort von T-Zellen (Good, 1962), waren die Voraussetzungen für die große Einteilung in B- und T-Lymphozyten sowie die Zuordnung ihrer unterschiedlichen Funktionen geschaffen worden. Es war relativ früh bekannt, daß T-Zellen nicht nur

eine zellgebundene Immunität (allergische Reaktionen vom verzögerten Typ, Immunität gegen Transplantationsantigene) vermitteln; sie konnten die Entwicklung der humoralen Immunantwort entscheidend unterstützen, ohne selber Immunglobuline zu produzieren (Humphrey, 1964; Cooper, 1966; Miller, 1968).

Je nach Art des Antigens war bei der Immunisierung die Anwesenheit von T-Zellen notwendig (Davis, 1970). Man unterschied zwischen T-Zell-unabhängigen und T-Zell-abhängigen Antigenen. Diese Einteilung wurde zunächst mit Hilfe von in vivo Versuchen bei Mäusen unternommen und später in Kulturen nachvollzogen. In vivo wurden entweder T-Zell-defiziente Mäusestämme (Mosier, 1977) oder Mäuse, denen unmittelbar nach der Geburt der Thymus entfernt wurde (Davis, 1970), benutzt. In vitro konnten T-Zell-freie Lymphozyten präpariert und eingesetzt werden (Wetzel, 1981). Mit diesen T-Zell-freien Immunisierungsmodellen konnten Antigene entweder als abhängig oder unabhängig von T-Zellen charakterisiert werden. Es zeigte sich, daß diese Einteilung je nach Testsystem unterschiedliche Ergebnisse brachte. Es wurde deutlich, daß T-Zellen in irgendeiner Form immer an der Immunisierung und der B-Zelldifferenzierung beteiligt waren. Die in vivo Systeme waren nicht einwandfrei als T-Zell-unabhängige Systeme anzusehen (Pike, 1984).

Das Verständnis für die Abhängigkeit der B-Zellantwort von helfenden T-Zellen wurde größer, als man die einzelnen Schritte der B-Zelldifferenzierung analysierte. Von großem Nutzen waren dabei Kulturtechniken, die es erlaubten, definierte Zellpopulationen einzusetzen. Antigenetische Marker (Cantor, 1975) ermöglichten die phänotypische Erkennung sowie die präparative Auftrennung von verschiedenen Subpopulationen der Maus-T-Zellen. Der Einsatz von Lymphozytenkulturen machte es ferner möglich, zelluläre Mediatoren zu erkennen, die in vivo Experimenten nicht nachweisbar waren. Für die B-Zelldifferenzierung in der Maus bedeutete dies zu-

nächst, daß man die Enddifferenzierung zu Plasmazellen einem lymphozytären Faktor aus T-Zellen (T-cell Replacing Factor, TRF, Schimpl. 1972) zuordnen konnte. In definierten Systemen war TRF in der Lage, anstelle von ganzen T-Zellen die Ausbildung von Plasmazellen einzuleiten. Dieser Faktor zeigte keine Spezifität für Antigene und war nicht vom "Major Histokompatibility Complex" (MHC) der Empfänger- oder Spenderzellen abhängig. Die Faktoren wurden aus den Überständen von aktivierten Lymphozytenkulturen gewonnen. Anfänglich schrieb man diesem Faktor eine omnipotente Wirkung in der gesamten B-Zellentwicklung, d. h. auch für die B-Zellproliferation, zu. Eine biochemische Anreinigung war wegen der geringen Proteinkonzentrationen dieses Faktors am Anfang relativ schwierig. Erst später gelang es, zu zeigen, daß die Differenzierung zu sezernierenden Plasmazellen und die vorangehende Proliferation von B-Zellen distinkte Schritte waren, die sich durch unterschiedliche Faktoren steuern ließen.

Eine große Hilfe bei der Analyse der lymphozytären Mediatoren (Lymphokine) war die Möglichkeit mit klonierten T-Zelllinien zu arbeiten, die entweder mit T-Zellwachstumsfaktoren und allogenen Feederzellen in kontinuierlicher Kultur gehalten werden konnten oder durch eine Fusion mit Thymomazellen unsterblich gemacht werden konnten (Goldsby, 1977). Die löslichen Produkte dieser T-Zelllinien konnten als monoklonale Lymphokine in ihrer Funktion gegenüber anderen Lymphokinen besser abgegrenzt werden, als das mit biochemischen Methoden möglich war (s. Tab. 1 und 2). In der B-Zellentwicklung unterscheidet die heutige Nomenklatur zwischen BCGF und BCDF (B-Cell Growth Factor, B-Cell Differentiation Factor). BCGF und BCDF unterstützen dabei exklusiv die Proliferation bzw. die Induktion zu sezernierenden Plasmazellen. Ihre Wirkung kann allerdings nur in Kultursystemen nachgewiesen werden.

Während die helfenden Funktionen der T-Zellen mit ihren Mediatoren antigenunspezifisch sind und genetische MHC-Barrieren zwischen verschiedenen Mäusestämmen überspringen können, kann

der Vorgang der antigenspezifischen Aktivierung von B-Zellen bei T-Zell-abhängigen Antigenen nur mit Hilfe von "geprimten" T-Zellen aus MHC-kompatiblen Spendermäusen durchgeführt werden. Die Antigen-präsentierenden T-Zellen mußten vorher mit dem Antigen Kontakt gehabt haben und spezifisch selektioniert worden sein. Ihre Spezifität bezieht sich nicht auf die antigene Determinante (das Hapten), die die B-Zelle mit ihren membrangebundenen Immunglobulin erkennt, sondern auf den "Carrier" der antigenen Determinante (Mitchison, 1971).

Die Erkenntnisse des Tiermodells machen zusammengekommen folgendes deutlich: Die Hilfe der T-Zellen reguliert mindestens drei voneinander abzugrenzende Schritte in der Entwicklung einer Antikörperantwort:

1. Die Hilfe bei der antigenspezifischen Aktivierung von B-Zellen mit T-Zell-abhängigen Antigenen. Diese Unterstützung ist carrierspezifisch und MHC-restringiert. Die Hilfe kann nicht durch lösliche Faktoren ersetzt werden. Bestimmte Antigene, wie z. B. Bakterien oder Polysaccharide, benötigen allerdings keine T-Zellhilfe bei der B-Zellaktivierung.
2. Die Hilfe bei der Proliferation und Expansion von aktivierten B-Zellen. Sie kann in Kultursystemen durch den löslichen T-Zellfaktor BCGF ersetzt werden. Diese Hilfe ist weder antigenspezifisch noch MHC-restringiert.
3. Die Hilfe bei der Ausbildung von Ig-sezernierenden Plasmazellen. Die neuesten Veröffentlichungen (s. Tab. 1 und 2) zeigen, daß hier eine isotypenspezifische Hilfe möglich ist, die die Ausbildung von bestimmten Immunglobulin-klassen steuert. Auch diese Hilfe kann durch lösliche Faktoren (BCDF) ersetzt werden und ist weder antigenspezifisch noch MHC-restringiert.

Tab. 1: Monoklonale T-Zellfaktoren für die murine B-Zellentwicklung

Autor	Form der Zelllinie	Bezeichnung	positive Aktivitäten	negative Aktivitäten
Takatsu 1980 Pure 1981	Hybridom	B151 K12	TRF	IL1, TCGF
Swain 1981, 1982 Wetzel 1982 Pure 1981	alloreakt. T-Zelllinie	C.C3.11.75 (Dennert line)	(DL) TRF, IFN, (DL) BCGF	IL1, TCGF
Howard 1982 Pike 1982 Brooks 1983	Thymom	EL4	BCGF, BCDFu, BCDF , BGDF, TCGF	IL1
Pike 1982	Hybridom	T6, 123	BGDF, TCGF	
Parker 1982 Leibson 1982 Endres 1983	Hybridom	FS6-14.13	TCGF, BCGF	
Brooks 1983 Pure 1983 Kappler 1981	alloreakt.T-Zelllinie " Hybridom	7.1.1a 7.1.2C7 B6	BCGF, BCDFu, BCDF γ BCDF γ BCDFu	IL1, TRF BCDFu, BCGF, IL1, TRF BCGF, BCDF γ
Lernhardt 1982	Hybridom	A32-26	BCGF	TCGF, TRF, CSF, BMF
Garchon 1983	Hybridom	T91	BCGF	IL1, TRF, TCGF
Elkins 1983	Hybridom	14G3.1f2	TRF (BCDF)	BCGF, TCGF
Leanderson 1982	Hybridom	TUH3	BCGF	TCGF, BCMF, TRF
Pettersson 1983	alloreakt.T-Zelllinie	C11	BCGF	BCMF

Tab. 2: Monoklonale T-Zellfaktoren für die humane B-Zelldifferenzierung

Autor	Form der Zelllinie	Bezeichnung	positive Aktivitäten	negative Aktivitäten
Kaieda 1982	alloreakt. T-Zelllinie	d4	TRF, KHF, TCGF, γ IFN	α IFN
Butler 1983	Hybridom	2B11	BCGF	TCGF
Okada 1983	Hybridom Hybridom	77A 90E	BCGF BCDF	BCDF, TCGF BCGF
Jay 1982	Hybridom	J1.3	BCDF α	BCDF μ , BCDF

1.4. Die Bedeutung der Aktivierung von B-Zellen (s. Abb. 3)

Die Aktivierung der B-Zellen beinhaltet bei der Differenzierung die Prozesse, die dazu führen, daß die ruhende, reife B-Zelle von der G_0 - in die G_1 -Phase des Zellcyclus eintritt und reaktiv für die Helferfaktoren wird. Wie an anderer Stelle erwähnt, trägt diese ruhende, reife B-Zelle membran-gebundenes IgM und IgD. Während der Aktivierung geht das membrangebundene IgD verloren (Kuritani, 1982). Die B-Zelle wird etwas größer, und ihre Dichte nimmt ab.

Eine Aktivierung kann durch Antikörper gegen IgM und IgD induziert werden. Aktiv sind dabei bivalente $F(ab)_2$ -, aber nicht monovalente $F(ab)$ -Untereinheiten der Antikörper (Romagnani, 1981; Yoshizaki, 1982). Dies läßt auf die Notwendigkeit eines "Bridging" der membrangebundenen Antikörper schließen, die als Rezeptoren einen induzierenden Reiz weiterleiten (Schreiner, 1976). Das Vernetzen bzw. Bridging der Antigenrezeptoren resultiert in einer meßbaren Membran-Depolarisierung und Abnahme des Membranpotentials (Monroe, 1983).

Das Bridging der membrangebundenen Antikörpermoleküle kann auch durch Staphylococcus aureus Zellen vom Stamm Cowan I (SAC) induziert werden. Romagnani et al. (1981) konnten nachweisen, daß das in der Bakterienzellwand gebundene Protein A neben der bekannten Bindung an den Fc-Teil von Immunglobulinen auch den $F(ab)$ -Abschnitt unspezifisch binden kann. Durch die Protein-A Matrix auf dem Bakterium kann eine Vernetzung der membrangebundenen Antikörper stattfinden, die zur polyklonalen Aktivierung führt. In der vorgelegten Arbeit wird die Inkubation von isolierten, humanen B-Zellen mit SAC dazu benutzt, die Zellen sensibel für Helferfaktoren zu machen. Im Maussystem wird hauptsächlich Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt, um B-Zellen zu aktivieren. Ähnliche Aktivierungsmechanismen sind bei bakteriellen Antigenen denkbar. Die Bakterien stellen durch ihre Zellwand eine Matrix für sich wie-

Abb. 3:

Aktivierung von B-Zellen

kleine, ruhende, reife B-Zelle

Zellcyclus: G_0

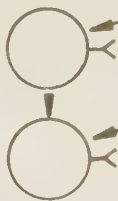
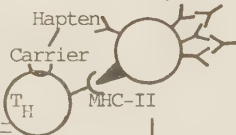


T-Zell abhängige Aktivierung
2-Rezeptoren-Modell

T-Zell unabhängige Aktivierung
durch Bridging
polymere Antigene (Bakteri
SAC, anti-IgM, anti-IgD

Antigen-präsentierende T-Helfer-
zelle mit Rezeptor für
1. Carrier, 2. MHC-II
aktivierter B-Zellblast
mit BCGF-Rezeptor, mIgM
Zellcyclus: frühe G_1

späte G_1
↓
S
↓
 G_2
↓
M



DNA-Synthese

Proliferation
klonale Expansion



isotypenspezifische Differenzierung, Ig-Sekretion

derholende Antigene dar. Da jeweils nur eine Antigen-spezifität durch einen B-Zellklon über die membrangebundenen Antikörper exprimiert wird, muß eine gewisse Antigendichte auf den Bakterien vorherrschen, um eine Vernetzung der Antigenrezeptoren zu ermöglichen. Mit Dinitrophenol (DNP) konjugiertem Polyacrylamid konnte festgestellt werden, daß mindestens 20 DNP-Haptene auf der Polyacrylamid-Matrix miteinander verbunden sein mußten, um immunogen zu sein und B-Zellen zu aktivieren (Dintzis, 1983).

Die Antigen-präsentierende Hilfe von T-Zellen bei der B-Zellaktivierung stellt eine andere Möglichkeit der hapten-spezifischen Induktion dar. Hier ist durch das Antigen alleine keine Vernetzung der membrangebundenen Immunglobuline möglich. Bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung bindet die T-Zelle den Carrier des Antigens und die B-Zelle des Hapten des Antigens. Beide Zellen bekommen dadurch einen engen Zellkontakt. Die antigenpräsentierenden T-Zellen sind allerdings nur in autologen Systemen reaktiv und MHC-restringiert. Die genetische Restriktion beinhaltet die Vorstellung, daß der Zellkontakt bei der Antigenpräsentation zwischen T- und B-Zelle durch eine zweite, MHC-Antigen-vermittelte Verbindung ergänzt wird. Die T-Helferzelle besitzt einen spezifischen Rezeptor für das autologe MHC-Antigen. Diese doppelte "Brücke" zwischen T-Zelle und B-Zelle kann die B-Zelle aktivieren und macht sie reaktiv für lösliche Helferfaktoren. Die den Zellkontakt vermittelnden MHC-Antigene auf der B-Zelle sind der Klasse II (MHC-II) zuzuordnen. In der Maus sind das die "Immuneresponse region associated" (Ia)-Antigene. Sie entsprechen beim Menschen den "Human Leucocyte-Antigen"-(HLA)-DR-Antigenen.

Der Übergang von der frühen G_1 - in die späte G_1 -Phase des Zellcyclus wird durch BCGF induziert. Dieser Faktor stammt aus aktivierten T-Zellen, ist aber weder antigenspezifisch noch MHC-restringiert. Die Aktivierung der BCGF-produzierenden Helferzellen kann ebenfalls durch das Antigen stattfinden. Die Aktivierung der Helferzelle ist ein Prozeß, an

dem eine Antigenpräsentation durch Makrophagen/Monozyten sowie eine MHC-restringierte Erkennung zwischen den Monozyten und den T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. In den humanen in vitro Systemen kann PWM ersatzweise eine Aktivierung von Helferfaktoren induzieren. In den Experimenten wird später PWM-induzierter PBL-Überstand als Quelle für Helferfaktoren in einem SAC-aktivierten B-Zellsystem eingesetzt.

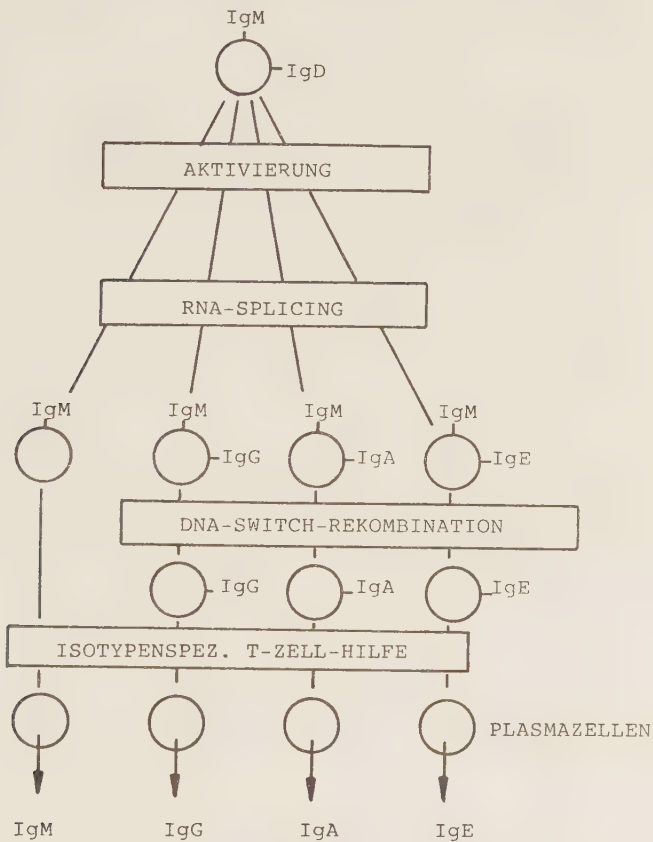
Neben BCGF scheint auch IL-1 aus den aktivierten Makrophagen den Zellcyclus der aktivierten B-Zelle synergistisch zu beeinflussen (Howard, 1983). Die Proliferation der aktivierten B-Zellen resultiert in einer klonalen Expansion, die unter anderem den Anteil der antigenspezifischen Gedächtniszellen erhöht. Wahrscheinlich kehren diese Gedächtniszellen ("Memory Cells") wieder in einen ruhenden G_0 -Status zurück, in dem sie erneut durch Antigen aktiviert werden können. Letztendlich kann die BCGF-induzierte Proliferation aber auch in die isotypenspezifische Enddifferenzierung einleiten, die unter dem Einfluß von Differenzierungsfaktoren (BCDF) zur Bildung von Ig-sezernierenden Plasmazellen führt.

Die Ausführungen machen deutlich, daß das Prinzip der B-Zellaktivierung eine antigenspezifische Reaktion gewährleistet. Für die Wahrung der Homöostase können Regulationsmechanismen z. B. bei der Produktion der antigenunspezifischen Proliferationsfaktoren (BCGF) eingreifen.

1.5. Die Differenzierung zu Plasmazellen (s. Abb. 4)

Der letzte Schritt zur Induktion von Plasmazellen wird durch lösliche Faktoren aus aktivierten T-Helferzellen eingeleitet. Die Etablierung monoklonaler T-Zelllinien (s. Tab. 1 und 2) ermöglichte die Erkenntnis, daß Helferfaktoren isotypenspezifischen Charakter haben können. Das heißt: es gibt für die verschiedenen Immunglobulinklassen unterschiedliche Differenzierungsfaktoren. Die Notwendigkeit einer bioche-

Abb. 4: Steuerung des Immunglobulin-Switch



mischen Trennung der Faktoren wird durch den Einsatz der monoklonalen T-Zellen auf geschickte Weise umgangen.

Die Zielzellen für die Differenzierung sind aktivierte, proliferierende B-Zellen. Auf ihrer Oberfläche ist neben IgM jeweils ein anderer Isotyp (außer IgD) nachzuweisen. Es treten also zwei verschiedene Isotypen gleichzeitig auf der B-Zellmembran auf. Der Switch der membrangebundenen Immunglobuline wird auf der Ebene des Processing der primären RNA gesteuert. Die entsprechenden C_H -Gene sind noch nicht mit dem V_H -Gen rekombiniert. Yaoita et al. (1982) konnten das bei B-Zellen von SJA/9-Mäusen zeigen, die auf ihrer Oberfläche IgE neben IgM trugen. Es deutet alles darauf hin, daß der Switch der membrangebundenen Immunglobuline durch isotypenspezifische Splicingmechanismen gesteuert wird. Bei der Einwirkung von Differenzierungsfaktoren werden die entsprechenden Vorläuferzellen isotypenspezifisch selektionierte. Die Differenzierung führt zu einer DNA-Rekombination des klonalen V/D/J-Gens mit dem C_H -Gen. Der Immunglobulin-Switch manifestiert sich damit auch auf der Ebene der DNA. Die differenzierten Plasmazellen können dann nur noch einen Isotyp exprimieren. Es gibt Hinweise aus dem Maus-IgE-Modell, nach denen derartige Helferfaktoren eine spezifische Bindung zu der entsprechenden Immunglobulinklasse haben (Übersicht bei Ishizaka, 1984). Inwieweit das auch für die anderen Immunglobulinklassen gilt, ist noch offen.

1.6. Die Ausbildung einer IgE-Antwort

IgE vermittelt in seiner Effektor-Funktion anaphylaktische Reaktionen vom sogenannten Soforttyp. Nach der Einteilung von Coombs et al. (1975) ist das die allergische Reaktion vom Typ 1. Der Fc-Abschnitt des IgE zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten aus (König, 1976). Bei einer spezifischen Allergenreaktion mit den IgE-Molekülen auf der Mastzelloberfläche kann das Bridging der IgE-

Rezeptoren die Freisetzung von Histamin und anderen Mediatoren induzieren und eine anaphylaktische Reaktion hervorrufen. Eine Übersicht über die Mechanismen dieser Vorgänge ist bei Ishizaka (1978) und bei König (1981) zu finden.

IgE ist ein Immunglobulin, das besonders bei parasitären Infektionen mit Helminthen gebildet wird (Ogilvie, 1964). Die parasitäre Infektion stimuliert anfangs die polyklonale und später die antigenspezifische Ausbildung von IgE-Antikörpern (Jarrett, 1976). In der Maus und Ratte wird der Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) benutzt, um eine IgE-Antwort zu provozieren (Orr, 1971). Es gibt Hinweise, daß IgE im Zusammenspiel mit Mastzellen und eosinophilen Granulozyten eine bedeutende Rolle in der Abwehr von parasitären Infektionen spielen kann (Capron, 1978; Dessein, 1981; Sher, 1983).

Beim Menschen ist neben den Parasiten eine heterogene Gruppe von allergenen Substanzen in der Lage, IgE-Antworten zu induzieren. Zu den Allergenen können z. B. Blütenpollen, Pilzsporen, Hausmilben, Mehlstaub, Fischprotein, Bienengift, Wespengift, Penicilline etc. zählen. Diese Allergene vermitteln allergische Erkrankungen wie Heuschnupfen, extrinsisches Asthma, Formen der Urticaria, Lebensmittel- und Arzneimittelempfindlichkeiten. Wahrscheinlich sind die Adjuvanswirkung sowie bestimmte strukturelle Gemeinsamkeiten der Antigene entscheidend für die Induktion der IgE-Antwort.

Die Konzentration von IgE im Plasma weist eine große individuelle Streubreite auf (Waldman, 1972). Mit 2,7 Tagen hat IgE die geringste Halbwertszeit innerhalb der verschiedenen Immunglobulinklassen (Wells, 1980) und scheint auf die Regulation des Fließgleichgewichts angewiesen zu sein. Andere Halbwertszeiten zum Vergleich:

IgG: 21 Tage; IgA: 5 Tage; IgM: 5 Tage.

Die Steuerung des "IgE-Metabolismus" ist deshalb von besonderer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit soll besonders der Aspekt der IgE-Produktion in vitro Beachtung finden.

Die Bereitschaft einer IgE-Antwort ist bei der Maus genetisch restringiert. Bei einer Erstinfektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* können verschiedene Mäuserassen in "Low Responder" und "High Responder" eingeteilt werden (Übersicht bei Pfeiffer, 1983). Beim Menschen ist ebenso eine Tendenz der genetischen Abhängigkeit einer IgE-Antwort zu erkennen. Vererbungsstudien zeigen, daß die erhöhte Bereitschaft zu einer allergischen IgE-Antwort autosomal rezessiv vererbt wird (Willcox, 1978). Mehrere genetisch fixierte Krankheitsbilder sind mit einer drastischen Erhöhung des unspezifischen IgE-Spiegels im Serum zu korrelieren. Dazu gehören das Wiskott-Aldrich-Syndrom (Waldman, 1972) und die Neurodermitis.

Wichtige Erkenntnisse über die Regulation der IgE-Produktion sind im Maus- und Rattensystem gewonnen worden (Ishizaka, 1984). Zusammenfassend ergeben sich hier die folgenden Vorstellungen:

1. Die Induktion zur IgE-Sekretion wird durch voraktivierte T-Zellen vermittelt. SJA/9-Mäuse bilden bei einer Nb-Infektion IgE-tragende B-Zellen, die jedoch nicht zu sezernierenden Plasmazellen differenzieren. Erst der Transfer von T-Zellen aus Nb-infizierten SJL-Mäusen ermöglicht eine Differenzierung zur Sekretion (Hirano, 1983). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf die Existenz von IgE-spezifischen T-Helferzellen, die bei SJA/9-Mäusen im Gegensatz zu den SJL-Mäusen nicht funktionsfähig sind.
2. Die Entwicklung IgE-tragender B-Zellen kann durch lösliche Faktoren mit IgE-bindenden Eigenschaften beeinflusst werden. Sowohl ein potenzierender als auch ein supprimierender Faktor weisen eine IgE-bindende Eigen-

schaft auf. Es konnte gezeigt werden, daß beide sich durch den Glykolisierungsgrad unterscheiden. Der IgE-bindende Faktor wird in distinkten T-Zellen gebildet. Er beinhaltet zunächst als membrangebundenes Protein eine Rezeptorfunktion für IgE. Später wird der IgE-bindende Faktor freigesetzt, er hat erst eine suppressierende Aktivität, die sich später durch Glykolisierung mit Hilfe eines glykolisierenden Faktors (Glycolisation Enhancing Factor, GEF) in eine potenzierende Aktivität verwandelt (Übersicht bei Ishizaka, 1984). Die Induktion der T-Zelle, die IgE-bindende Faktoren freisetzt, wird ihrerseits durch Faktoren reguliert, die im Serum vorbehandelter Mäuse zu finden sind (Chen, 1981).

Die Regulation der IgE-produzierender B-Zellen stellt sich als eine komplexe Kaskade von T-Zellaktivierungen dar, die verbunden ist mit der Freisetzung von potenzierenden und supprimierenden Faktoren (Ishizaka, 1984).

Die Erkenntnisse über die Steuerung der IgE-Produktion beim Menschen zeigen, daß gewisse Analogien zu den Tiersystemen vorhanden sind. Der Einsatz von immunsuppressiven Maßnahmen (Zytostatika, Ganzkörperbestrahlungen bei Empfängern von Knochenmarkstransplantaten) bewirkt wie im Tiersystem (Chiorazzi, 1976) eine drastische Erhöhung des Serum-IgE-Spiegels (Ringden, 1983). Wahrscheinlich beruht der Mechanismus ähnlich wie im Tiersystem auf einer Inhibition von isotypenspezifischen Suppressorzellen. Weiterhin konnten humane T-Zellen, die mit TCGF und IgE zusammen kultiviert wurden, IgE-bindende Faktoren, allerdings in einer sehr geringen Konzentration, freisetzen (Ishizaka, 1981). Saryan et al. (1983) konnten IgE-induzierende Faktoren für die IgE-Produktion aus T-Zellen von Patienten mit einem Hyper-IgE-Syndrom gewinnen, die möglicherweise IgE-bindende Eigenschaften haben. Ein alloreaktiver T-Zellklon konnte isoliert werden, der isotypenspezifisch die IgE-Produktion von normalen B-Zellen induziert (Lanzavechia, 1983).

Sehr umstritten ist der Einsatz von polyklonalen Stimulatoren in humanen Lymphozytenkultursystemen. Pokeweed Mitogen (PWM) wurde für die Induktion der IgE-Produktion in Kulturen eingesetzt. Zu Beginn der achtziger Jahre stellten sich beim Einsatz von PWM noch widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur dar. Einige Autoren konnten eine Induktion beobachten (Saxon, 1980; Zuraw, 1981), andere Autoren hingegen nicht (Fiser, 1979; Tijo, 1979; Romagnani, 1980; Sampson, 1981; Holt, 1981; Hemady, 1983).

Die vorliegende Arbeit setzte sich zum Ziel, diesen Widersprüchen nachzugehen und die Kulturbedingungen für Ig (M, G, A) mit den Bedingungen für die Produktion von IgE zu vergleichen.

1.7. Das PWM-Aktivierungsmodell im humanen System

Die oben erwähnten, grundlegenden Erkenntnisse können parallel zum Tiermodell zum Teil auch in humanen Systemen nachvollzogen werden. Vor allen Dingen ist die Anpassung der in vitro-Techniken aus den Tiersystemen hilfreich für die Entwicklung von experimentellen Modellen beim Menschen. Eine große Schwierigkeit im humanen System ist die Einschränkung, in vivo-Manipulationen an lymphatischen Organen, experimentelle Immunisierungen, Zelltransferexperimente, Ganzkörperbestrahlungen etc. vorzunehmen, wie es im Tiersystem nahezu unbegrenzt möglich ist.

Auf die Differenzierung der B-Zellen bezogen heißt das, ein großer Teil der Versuche muß mit polyklonalen, artifiziellen Aktivatoren anstelle von Antigenen durchgeführt werden. Nur unter Vorbehalten kann die polyklonale B-Zelldifferenzierung in der humanen Lymphozytenkultur mit den antigenspezifischen, oligoklonalen Reaktionen der Tiermodelle verglichen werden. Für die polyklonalen B-Zell-Aktivierungssysteme stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Der meist benutzte B-Zell-Stimulator im humanen Modell ist das pflanzliche Lektin Pokeweed

Mitogen (PWM) aus der Kermesbeere (*Phytolacca americana*). Daneben ist der Einsatz von bakteriellen Produkten wie z. B. "Nocardia Water Soluble Mitogen" (NWSM, Brochier, 1976), *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC, Ringden, 1977) zu erwähnen. Eine andere Möglichkeit zur Stimulation der Ig-Produktion ist die sogenannte "Mixed Lymphocyte Culture" (MLC), in der die Lymphozyten genetisch verschiedener Spender als Mischung kultiviert werden (Chiorazzi, 1979). Auch eine Virus-induzierte B-Zelltransformation sei zu erwähnen. Der Einsatz von Epstein-Barr-Virus (EBV) kann B-Zellen polyklonal, unabhängig von T-Zellen, zur Differenzierung bringen (Bird, 1979).

Die PWM-induzierte Ig-Produktion in Kulturen menschlicher Lymphozyten ist in der klinischen Immunologie ein weit verbreiteter Test für die Funktionsfähigkeit der B-Zelldifferenzierung. Neben einer Induktion zur Proliferation von T- und B-Zellen ist dieses Mitogen in der Lage, Ig-sezernierende Plasmazellen zu induzieren. Diese Fähigkeit unterscheidet PWM von anderen mitogenen Lektinen wie Phytohämagglutinin (PHA, aus *Phaseolus vulgaris*) und Concanavalin A (ConA, aus *Canavalia ensiformis*), die keine Immunglobulinsekretion in Lymphozytenkulturen induzieren können. PHA und ConA werden hauptsächlich als polyklonale Aktivatoren für T-Zellen benutzt.

Die mitogene Wirkung des Pflanzenextraktes der Kermesbeere wurde 1964 von Farnes et al. zuerst beschrieben. Eine Blastentransformation konnte in humanen Lymphozytenkulturen mikroskopisch beobachtet werden. Auch in vivo wurden Effekte erkannt, als Labormitarbeiter sich beim Arbeiten mit den Wurzeln der Kermesbeere verletzten und Material der Pflanze in die Blutbahn geriet. Das Blutbild dieser Personen wies kurze Zeit später eine große Anzahl von Plasmazellen auf (Barker, 1965). Die mitogene Substanz der Kermesbeere (PWM) wurde isoliert und beschrieben (Börjeson, 1966). Die biologische Wirkung konnte in Lymphozytenkulturen weiter analysiert werden

(Chessin, 1966). Es zeigte sich, daß PWM in der Kultur die Ig-Sekretion der Plasmazellen induzierte. Es konnte von Keightley (1976) und Fauci (1976) nachgewiesen werden, daß die Wirkung des PWM von der Anwesenheit der T-Zellen abhängig war. PWM alleine konnte reine B-Zellkulturen nicht zur Differenzierung bringen. Die weiteren Analysen zeigten, daß neben den T-Zellen auch Makrophagen/Monozyten bei der Induktion der B-Zelldifferenzierung nötig waren (Rosenberg, 1981; Gerrard, 1982). Es wurde deutlich, daß PWM mit der Hilfe von Monozyten T-Zellen aktivierte, die eine unterstützende Funktion bei der B-Zelldifferenzierung ausübten.

Andere Lektine, wie z. B. ConA, aktivieren dagegen vorzugsweise supprimierende T-Zellen (Rich, 1974). Die Einteilung in T-Helfer und T-Suppressor-Zellen wurde in Analogie zum Maussystem vorgenommen. Wie in der Maus war es auch im menschlichen Modell möglich, Oberflächenmarker für Helfer- und Suppressorzellen zu finden. Eine Differenzierungsmöglichkeit bestand in der unterschiedlichen Verteilung von Fc-Rezeptoren für IgM und IgG. Moretta et al. (1979) konnten zeigen, daß T-Zellen mit Rezeptoren für Fc μ Helferfunktionen ausführten, T-Zellen mit Rezeptoren für Fc γ hatten hingegen supprimierende Funktionen in der B-Zelldifferenzierung. Weiterhin konnte ein Antiserum gegen Suppressorzellen entwickelt werden (Evans, 1977). Das Suppressorzellantigen wurde TH2, das entsprechende Antigen für die Helferzellen wurde TH1 genannt. Die Einführung monoklonaler Antikörper mit der Hybridomatechnik von Köhler und Milstein (1976) machte es weiter möglich, eine Reihe von humanen T-Zell-Antigenen zu beschreiben (Reinherz, 1979; Ledbetter, 1981). So konnte man den Helferzellen im PWM-System das Antigen T4 bzw. Leu3 zuordnen. Die Suppressorzellen trugen entsprechend die Antigene T8 und Leu2.

PWM induziert die Immunglobulinproduktion bei den Isotypen IgM, IgG und IgA. Wie bereits erwähnt, ist die Induktion der IgE-Produktion umstritten (Saxon, 1981; Buckley, 1981). Die vorgelegte Arbeit wird versuchen, hier weitere Erkenntnisse und Klarheiten zu gewinnen. Der Mechanismus der B-Zellaktivierung ist relativ komplex. Eine Kaskade von lymphozytären und monozytären Aktivierungen findet statt, ehe die B-Zellen differenziert werden und auf Helferfaktoren (BCGF bzw. BCDF) reagieren. In der unterschiedlichen Aktivierbarkeit von isotypenspezifischen T-Helferzellen liegt möglicherweise der Schlüssel für das Problem der fehlenden Stimulation der IgE-Produktion.

Der Aktivierungsmechanismus der ruhenden B-Zellen, die von der G_0 -Phase des Zellcyclus in die G_1 -Phase überführt werden müssen, um auf Helferfaktoren zu reagieren, ist bei der PWM-Aktivierung unbekannt. Eine Möglichkeit für die Aktivierung könnte darin bestehen, daß ein Überangebot an aktivierten T-Helferzellen einen Aktivierungsanreiz ersetzt (in der Maus: Zubler, 1982; beim Menschen: Clement, 1984). Ähnliche Effekte können auch für die Induktion der Immunglobulinproduktion in der MLC verantwortlich gemacht werden.

Eine andere Erklärung wäre, daß nur ein relativ geringer Anteil von in vivo-aktivierten B-Zellen ausreicht, um von BCGF und BCDF der PWM-aktivierten Helferzellen in die Differenzierung gebracht zu werden, und daß dieser Anteil ausreicht, um meßbar zu sein. Diese These wird durch die Experimente von Kuritani und Cooper (1982) gestützt. Die Autoren konnten im humanen PWM-Modell zeigen, daß lediglich IgD negative, IgM positive B-Zellen im PWM-System aktivierbar sind. Aus der Zellmorphologie und Zelldichte schlossen sie, daß diese Zellen möglicherweise in vivo zu Blasten voraktiviert waren. Ruhende B-Zellen, die neben membrangebundenem IgM IgD trugen, konnten durch PWM-aktivierte Helferzellen nicht zur Immunglobulinproduktion induziert werden. Erst nach einer in vitro-

Aktivierung durch anti-IgD-Antikörper wurden die B-Zellen reaktiv für PWM-induzierte Helferfaktoren.

Ein anderer Oberflächenmarker konnte ebenfalls mit der mangelnden Reaktionsfähigkeit von B-Zellen in Verbindung gebracht werden; humane B-Zellen, die einen Rezeptor für Mäuseerythrozyten aufwiesen, reagierten nicht in der PWM-aktivierten Lymphozytenkultur (Kuritani, 1982; Davey, 1983). Stevens (1982) schätzte aufgrund von "Limiting Dilution"-Analysen den Anteil der im PWM-System aktivierbaren B-Zellen des peripheren Blutes auf 1 - 2 %.

Die PWM-induzierte B-Zelldifferenzierung scheint also

1. von der Anwesenheit voraktivierter B-Zellen,
2. von der Produktion der Helferfaktoren (BCGF und BCDF) abzuhängen.

Ein weiterer Punkt, der die B-Zelldifferenzierung beeinflusst, ist allerdings auch die Anwesenheit von aktiven T-Suppressorzellen in der Kultur. Suppressorzellen sind bei der PWM-Aktivierung normalerweise nicht sofort, sondern erst nach sechs Tagen aktiv (Tsokos, 1982). In bestimmten Fällen jedoch können möglicherweise durch in vivo-Voraktivierungen von Suppressorzellen, Situationen in der Kultur entstehen, die die Wirkung der T-Helferzellen blockieren, so daß die Ig-Produktion ausbleibt.

Zusammengenommen bedeutet dies, daß Versuche, eine fehlende Stimulierbarkeit in der Kultur zu interpretieren, sich sehr schwierig gestalten können, da sehr viele Faktoren einen Einfluß auf die Produktion der Immunglobuline haben.

Die phänotypische Bestimmung des Verhältnisses von Helfer- und Suppressorzellen mit der Hilfe von T-Zellmarkern (z. B. T4/T8) kann die Aussage über die funktionellen Eigenschaften dieser Zellen nur ergänzen (Reinherz, 1981).

In der vorgelegten Arbeit werden die experimentellen Bedingungen für die PWM-Stimulation in der PBL-Kultur untersucht. Weitergehend werden die einzelnen Schritte der B-Zelldifferenzierung untersucht. Dazu gehören

1. die Aktivierung von ruhenden B-Zellen,
2. die Produktion von Helferfaktoren,
3. die Reaktion isolierter B-Zellkulturen auf definierte Helferfaktoren,
4. der Einfluß von Suppressorzellen.

1.8. Fragestellung

Wie in der Einleitung ausgeführt, stellt sich die Entwicklung einer humoralen Immunantwort als ein komplexer Vorgang der B-Zelldifferenzierung dar, der durch ein Netzwerk von feinen Regulationsmechanismen in das lymphatische System eingebunden ist. Die grundlegenden Erkenntnisse sind in Tiermodellen gewonnen worden. Im Gegensatz zur Immunbiologie des Menschen, bestehen hier nahezu uneingeschränkte Möglichkeiten zu Experimenten in vivo als auch in vitro. Die Konzepte der B- und T-Zellimmunologie, der Immungenetik, der Helfer- und Suppressorzellen, um nur einige zu nennen, sind mit Hilfe von Tiermodellen entwickelt worden. Die Immunbiologie des Menschen hat das Ziel, die Vorstellungen aus der Tierimmunologie über die Regulation einer Immunantwort in das menschliche System zu übertragen. Die Methodik unterscheidet sich jedoch insofern von der Tierimmunologie, daß Experimente vorwiegend in der Kultur durchgeführt werden müssen. Auf experimentelle Vorbehandlungen in vivo muß weitgehend verzichtet werden. Zusammengefasst ergeben sich daraus die Schwierigkeiten für die Untersuchungen am menschlichen System:

1. Es steht nur eingeschränkt peripheres Blut als Untersuchungsmaterial zur Verfügung.
2. Es gibt keine einheitlichen Spenderkollektive.
3. Immunreaktionen können erst in der Kultur induziert werden.

Unter Berücksichtigung dieser Problematik ergaben sich folgende Fragestellungen und Aufgaben:

- a) die Aktivierung der polyklonalen Immunglobulinproduktion in Kulturen von peripheren Blutlymphozyten unter der besonderen Berücksichtigung der IgE-Produktion,
- b) die Regulation der Immunglobulinproduktion durch lymphozytäre Faktoren,
- c) die Messung der modulatorischen Aktivitäten der löslichen T-Zellfaktoren in isolierten Zell-Systemen.

Die Arbeit sollte immunpharmakologische und differentialdiagnostische Perspektiven in enger Zusammenarbeit mit der humanbiologischen Grundlagenforschung auf dem Gebiet der B-Zell-differenzierung eröffnen.

Im folgenden Abschnitt soll die Planung bei der Durchführung dieser Aufgaben erläutert werden. Als Parameter für die Ausbildung von Plasmazellen bot sich die Freisetzung der verschiedenen Immunglobulinklassen in Kulturüberständen an. Dazu war die Etablierung von empfindlichen und spezifischen Meßmethoden notwendig. Diese Aufgabe sollte durch den Einsatz von Radioimmunoassays gelöst werden. Besonders die Messung von IgE in Kulturüberständen verlangte eine hoch empfindliche und spezifische Nachweismethode, die Konzentrationen unter 1 ng/ml erfassen konnte. Die Methode, Immunglobulinkonzentrationen im Kulturüberstand zu messen, stand im Gegensatz zu der "Plaque-forming-cell" (PFC)-Methode, die von einem großen Teil der Autoren benutzt wird. Gegenüber der PFC-Methode hatte sie den Vorteil, in der Durchführung einfacher zu sein, die Messungen konnten besser standardisiert und verglichen werden. Es war möglich, vier Immunglobulinklassen in einem Überstand zu messen.

Im ersten Teil der Arbeit wird zunächst auf die Bedingungen der PWM-induzierten Ig-Produktion in PBL-Kulturen eingegangen. Hier werden die Kulturparameter den individuellen Anforderungen der Spender-PBL angepaßt. Während in fast allen Ver-

öffentlichungen nur eine einzige PWM-Konzentration der Kultur angeboten wurde, sollte hier auf das spenderspezifische PWM-Optimum Rücksicht genommen werden. Durch Variationen in der Zelldichte sollte demonstriert werden, welche unterschiedlichen Effekte bei der induzierten Immunglobulinproduktion auftreten. Ein wichtiges Problem war in der Überprüfung der These einer PWM-induzierbaren IgE-Produktion zu sehen. Variationen der Kulturbedingungen und Spenderkollektive sollten hier eine Klärung versuchen. Stimulationsmodelle für die IgE-Produktion würden es ermöglichen, die Regulation der IgE-Biosynthese besser zu erfassen.

Ergänzend zur PWM-induzierten Ig-Produktion sollte die Möglichkeit der Suppression und Potenzierung dieses Prozesses durch lösliche Faktoren untersucht werden. Hier wurde aus bestimmten Überlegungen, die gewonnenen Faktoren sollten frei von störenden Lektinen sein, der Einsatz von Festphasen-ConA in Form von ConA-Sepharose erprobt und erstmalig als Quelle für Suppressorfaktoren analysiert. Die Existenz löslicher Faktoren in derartigen lektinfreien Überständen von aktivierten Zellen sollte ergänzend zu den PBL-Kulturen in reinen T- und B-Zellkulturen analysiert werden. TCGF, BCGF und BCDF sollten als Standardfaktoren nachweisbar gemacht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verbrauchsmaterial

1. 24-Lochplatten für die Lymphozytenkultur aus Polystyrol, 16 mm Lochdurchmesser, Flachboden
2. 96-Lochplatten für die Lymphozytenkultur aus Polystyrol, 6,3 mm Lochdurchmesser, Flachboden (Code-Nr. 3072, Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg)
3. 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen, konisch (Code-Nr. 227 261, Greiner, Wuppertal)
4. 15 ml Zentrifugenröhrchen aus Polystyrol, konisch (Code-Nr. 2095, Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg)
5. 250 ml Gewebekulturflaschen aus Polystyrol, Wachstumsfläche 75 cm^2 (Code-Nr. 3042F, Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg)
6. 50 ml Gewebekulturflaschen aus Polystyrol, Wachstumsfläche 25 cm^2 (Code-Nr. 690 160, Greiner, Wuppertal)
7. Blutentnahmegesetz "Donafix" (Code-Nr. 4901185, Braun, Melsungen)
8. 300 μl U-Becher für den RIA, aus Polystyrol (Removawell cups aus Immunolon, Code-Nr. M174A, Dynatech, Denkendorf)
9. Dialysemembran für die Ultrafiltration "5000 MW cutoff" (Code-Nr. YM5, Amicon, Witten)
10. Dialyseschlauch für die J125-Markierung (Code-Nr. 44104, Serva, Heidelberg)
11. Membranfilter für die Sterilisation kleiner Volumina, Porengröße: $0,2 \mu\text{m}$ (Milex GV, Code-Nr. SLGV 025 BS, Millipore, Neu-Isenburg)
12. Membranfilter für die Sterilisation von Medium (Code-Nr. SM 11007142, Sartorius, Göttingen)

2.2. Medien und Lösungen

1. RPMI

RPMI 1640 Trockenmedium (Code-Nr. 074-1800, Gibco, Karlsruhe) wurde mit 2,00 g NaHCO_3 und 2,38 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) je 1000 ml versetzt und nach den Vorschriften des Herstellers in Aqua bidest. gelöst. Das aufgelöste Medium wurde durch Membranfiltration (Porengröße: 0,2 μm) unter Druck sterilfiltriert und in Glasflaschen bei 4° C aufbewahrt.

2. Kulturmedium

Das Medium für die Kultivierung der Lymphozyten wurde vor Gebrauch jeweils frisch angesetzt. Zu je 500 ml RPMI wurden hinzugegeben:

1. 50 ml fötales Kälberserum (FKS, Biochrom, Berlin), hitzeinaktiviert: 56° C, 30 min
2. 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (mit 10000E Penicillin, bzw. 10000 μg Streptomycin pro ml, Gibco, Karlsruhe).

3. PBS-Stammlösung (20fach konzentriert)

180,00 g NaCl
5,34 g KH_2PO_4
28,66 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
ad 1000 ml Aqua bidest.

4. PBS (physiologisch), pH 7,2

PBS-Stammlösung wurde 1 : 20 in Aqua bidest. verdünnt und bei Bedarf autoklaviert.

5. PBS-BSA

PBS wurde mit 0,5 % (w/v) BSA (Bovine serum albumin, Serva, Heidelberg) versetzt.

6. Lösungen für die J125-Markierung

Dialysepuffer BBS (Borate buffered saline

20fache Stammlösung:

180,00 g NaCl

6,10 g Borsäure

ad 1000 ml Aqua bidest.

Zum Gebrauch wurde die Stammlösung 1 : 20 mit Aqua dest. verdünnt. Der pH-Wert wurde mit konz. NaOH auf 7,3 gebracht.

0,3 m Pyrophosphatpuffer (PPP), pH 7,5

0,3 m Na_2HPO_4 - und 0,3 m NaH_2PO_4 -Lösung wurden miteinander auf pH 7,5 titriert.

0,1 m PPP, pH 7,5

wurde analog zu oben angesetzt.

PPP-BSA

0,3 m PPP wurde mit 1 % (w/v) BSA versetzt.

Chloramin-T-Lösung

1 mg Chloramin-T (Merck, Darmstadt) wurde in

1 ml 0,1 m PPP kurz vor Gebrauch aufgeißt.

Natriumdisulfit-Lösung für die Jod-Markierung

4,7 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ wurde kurz vor Gebrauch in

1 ml 0,1 m PPP aufgelöst.

NaJ125 , für die Markierung der Antikörper

(14,3 mCi/ μgJod , 100 mCi/ml bezogen auf das Kalibrierungsdatum, Code-Nr. IMS.30, Amersham Buchler, Braunschweig)

Antikörper für die J125-Markierung

Es handelte sich um affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper.

anti-IgM: 1 %ig aus dem Kaninchen

(Charge 15180, Behring, Marburg)

anti-IgG: 1 %ig aus dem Kaninchen

(Charge 22480, Behring, Marburg)

anti-IgA: 1 %ig aus dem Kaninchen
(Charge 29580, Behring, Marburg)

anti-IgE: aus der Ziege
(Prof. W. König, Bochum)

7. Antikörper zum Beschichten der RIA-Wells

anti-IgM: Ig aus der Ziege
(Code-Nr. 3102, Medac, Hamburg)

anti-IgG: Ig aus dem Kaninchen
(eigene Herstellung)

anti-IgA: Ig aus der Ziege
(Code-Nr. 3101, Medac, Hamburg)

anti-IgE: affinitätschromatographisch gereinigtes Ig
aus der Ziege
(Prof. W. König, Bochum)

8. Waschpuffer-Stammlösung für den RIA

22,5 g BSA gelöst in
100 ml PBS-Stammlösung +
650 ml Aqua dest.

9. Waschpuffer für den RIA

Stammlösung (s. 8.) 1 : 10 in Aqua dest. verdünnt.

10. Immunglobulinstandards

qualitative Standards für den Spezifitätsnachweis im RIA:

IgM, monoklonal (Op-Nr. 25277, Behring, Marburg)

IgG, monoklonal (Op-Nr. 24277, Behring, Marburg)

IgA, monoklonal (Op-Nr. 8376, Behring, Marburg)

IgE: Kulturüberstand der humanen Myeloma Zelllinie U 266
(Nilsson 1971)

quantitative Standards für die Erstellung von Eichkurven
im RIA:

Standardserum (Behring, Marburg)

11. Ficoll-Metrizoat, Trennmedium für die Isolierung von peripheren Blutlymphozyten:

108 ml 9 % (w/v) Ficoll 400 (Pharmacia, Freiburg)
20 ml Metrizoat (70 % w/v), (Molter, Heidelberg)
25 ml Aqua bidest.

Dieses Gemisch wurde durch Autoklavieren sterilisiert.
Es hatte eine Dichte von 1,075 - 1078 g/ml.

12. 100 % Percoll (isotonische Stammlösung)

Percoll (Pharmacia, Freiburg) wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Zu 9 Volumenteilen Percoll wurde 1 Volumenteil 10fach konzentrierter, steril filtrierter PBS-Puffer hinzugefügt.

13. Percollverdünnung für die Dichtgradientenzentrifugation:
isotonisches 100 % Percoll wurde mit RPMI auf die gewünschte Verdünnung gebracht.

14. Lektine

PWM-Stammlösung, 2 mg/ml

10 mg Pokeweed Mitogen aus *Phytolacca americana* (PWM, Code-Nr. L-9379, Sigma, München) wurde in 5 ml PBS gelöst, steril filtriert und portioniert bei - 20° C eingefroren.

ConA-Stammlösung, 2 mg/ml

10 mg ConcanavalinA aus *Canavalia ensiformis* (Code-Nr. 17-0450-01, Pharmacia, Freiburg) wurde in PBS-Puffer gelöst, der vorher mit konz. HCl auf pH 6,8 gebracht worden war, sterilfiltriert und in kleinen Portionen eingefroren.

PHA-Stammlösung, 2 mg/ml

10 mg Phytohämagglutinin aus *Phaseolus vulgaris* (PHA, Leucoagglutinin Typ IV, Code-Nr. L8504, Sigma, München) wurde in 5 ml PBS gelöst, steril filtriert und eingefroren.

15. Methylmannose (MM) als ConA-Inhibitor
alpha-Methyl-D-Mannosepyranosid (Code-Nr. M-6882, Sigma, München) wurde als eine 200mmol Stammlösung in Kulturmedium vor Gebrauch angesetzt und sterilfiltriert.
16. SAC für die Aktivierung von B-Zellen
Staphylococcus aureus (Cowan I) Zellen wurden als abgetötete Zellsuspension bezogen (Pansorbin, Code-Nr. 507858, Calbiochem, Gießen) und wie später unter Methoden beschrieben, mit Formaldehyd nachfixiert.
17. ConA-Sepharose
Über eine BrCN-Aktivierung kovalent gebundenes ConcanavalinA an 4B-Sepharose, 10 mg ConA pro ml Gelvolumen (Code-Nr. 17-0440-01, Pharmacia, Freiburg) wurde über Nacht in RPMI äquilibriert, 4 - 6 mal mit dem vierfachen Volumen RPMI gewaschen und zusätzlich zweimal in Kulturmedium gewaschen.
18. Lösungen für die Fixierung von ConA-Sepharose
0,25 m Karbonatpuffer, pH 8,8
0,25 m NaHCO_3 -Lösung und
0,25 m Na_2CO_3 -Lösung wurden durch Mischen auf pH 8,8 gebracht und sterilfiltriert.
1 m Tris-HCL Puffer, pH 7,8
1 m Tris-Lösung wurde mit 7n HCl auf pH 7,8 gebracht und sterilfiltriert.
1 m NaCl-Lösung, steril filtriert
50 % Glutaraldehyd in Wasser (Fluka, Buchs)

19. AET-Lösung für die Behandlung von Schaferythrozyten:
0,804 g S-Aminoethylisothiuroniumbromid $\times$ HBr (Serva, Heidelberg) wurden in 20 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wurde mit 4n NaOH auf 8,8 - 9,0 gebracht. Die Lösung wurde durch Membranfiltration sterilisiert. Sie wurde jeweils unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.
20. Propranolol (Beta-Rezeptoren-Blocker)
10 mg 1-(Isopropylamino)-3-(1-naphtyloxy)-2-propanol $\times$ HCl (Code-Nr. P3652, Sigma, München) wurden vor Gebrauch in 10 ml Kulturmedium gelöst und sterilfiltriert.
21. PMA
10 mg 4-beta-Phorbol-12-myristat-13-acetat (Code-Nr. P 3766, Sigma, München) wurde in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, mit Kulturmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt und sterilfiltriert.
22. H³-Thymidin, für die Messung des Thymidineinbaus
(6-H³-Thymidin, 5 Ci/mmol, 1 mCi/ml, Code-Nr. TRA.61, Amersham Buchler, Braunschweig), wurde mit Kulturmedium verdünnt, so daß in 10 μ l 0,2 - 0,5 μ Ci enthalten waren.
23. Szintillator
(Rotiszint 2200, Roth, Karlsruhe)
24. "Lymphocult", für die Kultivierung von T-Zelllinien,
TCGF/IL2-haltiger Überstand humaner Lymphozyten
(Lymphopocult-T, Biotest, Frankfurt)

2.3. Methoden

2.3.1. Markierung von Antikörpern mit J125

Die Markierungen wurden nach der Chloramin-T-Methode vorgenommen. Sie richteten sich nach den Arbeiten von Hunter et al. (1962, 1978) sowie von Klinman und Taylor (1969).

In einem 5 ml Plastikröhrchen wurden 100 µl des Antikörpers mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml mit 10 µl NaJ-125 versetzt. Diese Menge entsprach am Kalibrierdatum 1 mCi. Je nach Verfall hatte das J-125 bei der Markierung eine Aktivität von 0,7 - 1,2 mCi.

Durch Zugabe von 100 µl Chloramin-T-Lösung wurde die Markierungsreaktion bei Raumtemperatur gestartet. Nach 60 sec. vorsichtigem Schwenken wurde die Reaktion durch 100 µl Natriumdisulfit-Lösung gestoppt. Nach weiteren 60 sec. wurde das Reaktionsgemisch mit 500 µl BSA-PPP als Proteinträger versetzt und in einen vorbereiteten Dialyseschlauch überführt. Es wurde 2 x 24 h gegen jeweils 1300 ml BBS dialysiert. Danach wurde das Dialysiergut in ein 5 ml-Röhrchen überführt und bei 4° C aufbewahrt.

Im RIA konnten die markierten Antikörper bis zu zwei Monate nach der Markierung eingesetzt werden.

Die Effizienz der Markierung (Anteil des proteingebundenen Jods nach der Markierung) betrug in der Regel zwischen 75 und 85 %.

2.3.2. Durchführung des Radioimmunoassays (RIA)

Prinzip

Der RIA wurde nach der sogenannten Sandwich-Methode durchgeführt.

Im ersten Schritt wird der Antikörper an eine feste Phase gekoppelt. Im vorliegenden Fall wurden dafür Polystyrol-Gefäße benutzt. Durch einfache Inkubation des Antikörpers in PBS wurde das Protein an der Oberfläche absorbiert.

Damit keine weiteren Proteine an der Plastikoberfläche absorbiert werden, wurde die restliche Affinität des Polystyrol zu Protein mit einer BSA-Lösung abgesättigt.

Der gebundene Antikörper im Well kann bei der Inkubation mit der Probe des Antigen einfangen, so daß es über den Antikörper an der festen Phase gebunden ist.

In einer zweiten Inkubation kann radioaktiv markierter Antikörper an das gebundene Antigen gehen und ebenfalls an die feste Phase gebunden werden.

Die Menge der gebundenen Radioaktivität richtet sich also nach der gebundenen Antigenkonzentration und kann quantitativ analysiert werden.

Durchführung

Der RIA wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Saxon et al. (1980) durchgeführt.

Die U-Becher aus Polystyrol (Wells) wurden in einem Halter aus Styropor befestigt. Jeweils 200 µl einer frisch verdünnten Antikörperlösung (1 : 1000 - 1 : 500 in PBS) wurden bei 37° C für 2 - 4 h inkubiert und danach zweimal mit je 250 µl Waschpuffer ausgespült. Anschließend wurden die Wells für 30 min. mit 300 µl der Stammlösung der Waschlösung bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Wells zweimal gewaschen und sorgfältig trocken gesaugt. 200 µl der Probenverdünnung (in PBS-BSA) wurden in die einzelnen Wells gefüllt. Parallel zu den Proben wurde eine in Zweierstufen verdünnte Standardreihe eines Standardserums eingesetzt. Die gefüllten Wells wurden für 12 - 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal sorgfältig gewaschen und abgesaugt.

Der radioaktiv markierte Antikörper wurde jeweils frisch in PBS-BSA verdünnt, so daß in 200 µl der Verdünnung 50.000 - 200.000 cpm enthalten war. Das entsprach etwa

einer Aktivität von 150 - 600 nCi. Je 200 µl der verdünnten, markierten Antikörperlösung wurden in den Wells für 4 h bei 37° C inkubiert. Danach wurde die ungebundene Aktivität abgesaugt, und die Wells wurden dreimal mit Waschpuffer sowie abschließend fünfmal mit Leitungswasser sorgfältig gewaschen. Die trockengesaugten Wells wurden in 5 ml Plastikröhrchen gesteckt und im Gammacounter (LB MAG 312/315, 2-Zoll Detektor, Berthold, Wildbad) gemessen.

2.3.3. Berechnung der RIA-Eichkurve

Die Abb. 5 A und die Tab. 3 zeigen das Meßergebnis einer logarithmischen Verdünnungsreihe eines quantitativen IgM-Standards im RIA.

Die halblogarithmische Darstellung der gebundenen J-125-Aktivität läßt einen sigmoiden Verlauf der Bindungskurve erkennen, der typisch für alle Eichkurven eines "Sandwich"-RIAs ist.

Der Verlauf dieser Kurve kann mathematisch am besten durch eine sogenannte "logit-log"-Funktion dargestellt werden. Der Logit-Wert wird wie folgt berechnet:

$$\text{logit } x = \ln \frac{x}{1 - x}$$

Bei der Eichkurvenanpassung wird die gebundene Aktivität mit Hilfe dieser Funktion umgerechnet.

Die gemessene Aktivität wird zunächst korrigiert, indem sie um den Betrag der nichtspezifischen Bindung (NSB) verringert wird (s. Spalte 3 der Tab. 3). Diese Bindung wird prozentual auf die maximale Bindung B_{max} bezogen. B_{max} wird im Sättigungsbereich der Eichkurve bestimmt. Alle Meßwerte des RIAs werden auf B_{max} bezogen. In der Spalte 5 der Tabelle werden diese Werte nach der Logit-Funktion umgerechnet.

In der Abb. 5 B sind diese Logit-Werte in der Abhängigkeit von der logarithmischen Verdünnungsreihe dargestellt. Für den gültigen Meßbereich kann nahezu ein linearer Zusammenhang der Werte in Form einer Geradenfunktion erkannt werden. Die Berechnung einer Regressionsgerade macht es möglich, eine Eichfunktion zu erstellen, die auf die relative Bindung $B/B_{\max}$ zurückgerechnet werden kann.

In der Abb. 5 C ist diese rückgerechnete Funktion dargestellt. Die sigmoide Form dieser Anpassungsfunktion ist für den gültigen Meßbereich nahezu identisch mit der tatsächlich gemessenen Eichkurve. In der Praxis kann die Eichfunktion vom Gammacounter maschinell berechnet werden. Die Regression kann auch durch eine quadratische oder kubische Funktion berechnet werden. Zusätzlich werden in der maschinellen Berechnung Wichtungen der Meßwerte vorgenommen, die vom Fehler der Parallelmessungen beeinflußt werden.

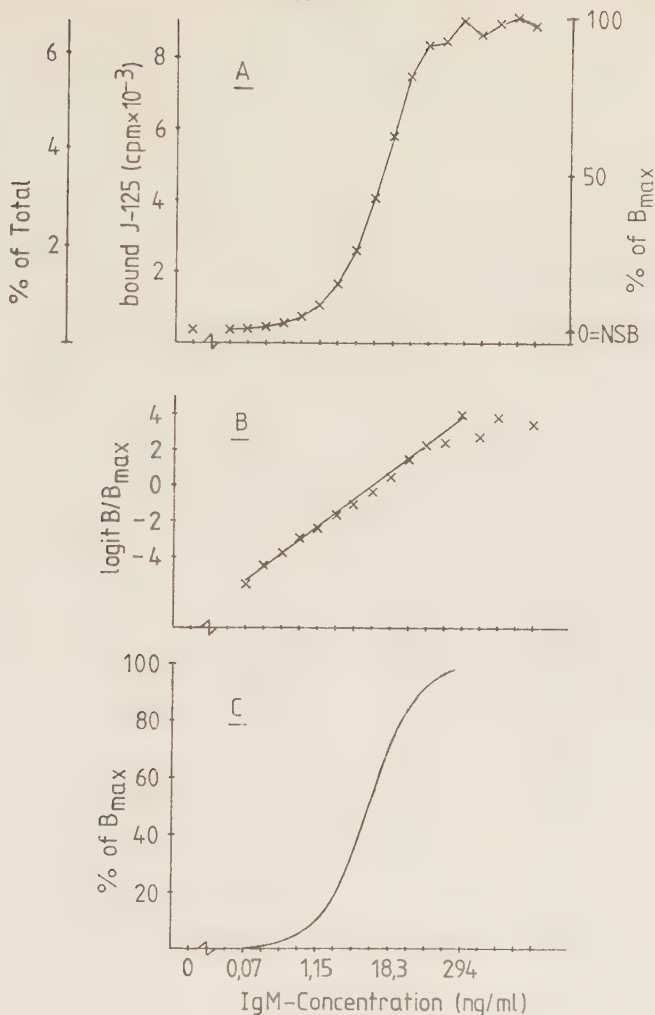


Abb. 5: Beispiel für die Herstellung einer Eichkurve für den IgM-RIA

- Die logarithmische Verdünnungsreihe eines Standardserums wurde wie im Test beschrieben im IgM-RIA eingesetzt. Gemessen wurde die gebundene J-125-Aktivität in cpm-Einheiten. Eingezeichnet sind die Mittelwerte von Duplikaten. Die maximale Bindung B_{max} und die minimale Bindung NSB wurden auf der rechten Ordinate eingezeichnet. Die maximale Bindung betrug etwa 6 % der eingesetzten Totalaktivität.
- Umformung der relativen Bindung (bezogen auf B_{max}) nach der logit-Funktion und Anlegen einer Regressionsgeraden.
- Aus der Regressionsgeraden rückgerechnete Eichfunktion.

Tabelle 3

Berechnung der RIA-Eichkurve

IgM-Konz. (ng/ml)	Meßwert (cpm)	korr.Meßw. (cpm-NSB)	B/Bmax (%)	logitB/Bmax ($\ln \frac{B/B_{\max}}{1-B/B_{\max}}$)
4710	8899	8518	96,98	3,4692
2355	9164	8783	100,00	---
1177,5	8984	8603	97,95	3,8666
588,75	8600	8219	93,58	2,6794
294,375	9019	8638	98,35	4,0878
147,188	8443	8062	91,79	2,4142
73,594	8352	7971	90,75	2,2835
36,797	7488	7107	80,92	1,4448
18,398	5769	5388	61,35	0,4620
9,199	4054	3673	41,82	-0,3302
4,600	2595	2214	25,21	-1,0874
2,300	1689	1388	14,89	-1,7432
1,150	1080	699	7,96	-2,4478
0,575	763	382	4,35	-2,9550
0,287	549	168	1,91	-3,9388
0,144	483	102	1,16	-4,4451
0,072	414	33	0,38	-5,5689
0,036	380	-1	---	---
NSB	381	0	---	---

2.3.4. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) (Nach Boyum, 1968)

200 ml Blut wurde unter sterilen Bedingungen aus der Armvene freiwilliger Spender mit einem Abnahmebesteck entnommen und in einem Gefäß mit 4000 UPS-Einheiten Heparin (Heparin Grade II, Sigma, München) aufgefangen.

Das Blut wurde mit sterilem, physiologischem PBS verdünnt, so daß sich ein Gesamtvolumen von 320 ml ergab. In 50 ml Plastikröhrchen wurden je 40 ml verdünntes Blut über je 10 ml Ficoll-Metrizoat geschichtet. Die gefüllten Röhrchen wurden anschließend 30 min. bei 375 xg (20° C) zentrifugiert. Während die Erythrozyten und Granulozyten in den Dichtegradienten hineinsedimentierten, blieben Lymphozyten und Makrophagen über dem Trennmedium und waren als weißliche Schicht zwischen dem gelben Plasma und dem farblosen Ficoll-Metrizoat zu erkennen.

Die Zwischenschicht wurde abgesaugt und in einem 50 ml Röhrchen abzentrifugiert (15 min., 375 xg, 4° C).

Das Sediment wurde zweimal mit je 40 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zentrifugationen erfolgten jeweils 10 min. bei 170 xg (4° C). Am Schluß wurden die Zellen im Kulturmedium suspendiert, mikroskopisch gezählt und weiterverarbeitet.

2.3.5. Kultivierung der peripheren Blutlymphozyten

2.3.5.1. Messung der Immunglobulinproduktion

Ein großer Teil der Experimente wurde mit frisch isolierten PBL durchgeführt. Die Kultivierung der PBL wurde meist in Medium durchgeführt, das sich aus dem synthetischen Medium RPMI 1640, 10 % fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin zusammensetzte. Für die Messung der Immunglobulinproduktion wurden die Zellen in den Kavitäten von 24-Lochplatten kultiviert. In der Regel wurde ein Volumen von 1,5 ml eingefüllt. Die später angegebenen Zelldichten

beziehen sich auf dieses Volumen. Die Kultur wurde bei 37° C in einem Brutschrank vorgenommen, der für eine hohe Luftfeuchtigkeit sorgte, damit die Kulturen kein Wasser verloren. Außerdem herrschte in dem Brutschrank eine 5 %ige CO₂-Atmosphäre als Puffersystem im Zusammenspiel mit dem NaHCO₃ des Mediums.

Bei Ansätzen mit verschiedenen Faktoren wurden je Ansatz drei Parallelen angelegt und später getrennt gemessen.

Die Konzentration der sezernierten Immunglobuline wurde in den Überständen der Kulturen bestimmt. Dafür wurden die Zellkulturen nach der gewünschten Kulturdauer suspendiert, in 5 ml Plastikröhrchen überführt und 10 min. bei 170 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig dekantiert und bis zur Messung im RIA eingefroren. Im RIA mußten die Proben für die Messung der IgM-, IgG- und IgA-Konzentration 1 : 10 bis 1 : 50 verdünnt werden. Für die IgE-Messung wurden die Überstände unverdünnt im RIA eingesetzt. In der Regel wurden die RIA-Messungen der einzelnen Überstände in Duplikaten durchgeführt.

2.3.5.2. Messung des Thymidineinbaus

Die Aufnahme von radioaktiv markiertem Thymidin in Lymphozytenkulturen diente als Maß für Transformation der Zellen in DNA synthetisierende Zellen. Die Lymphozytenkulturen wurden in 96-Lochplatten angelegt bzw. vor der Messung in diese überführt. Das Kulturvolumen betrug je nach Ansatz 100 - 200 µl. Das H-3-Thymidin wurde mit Kulturmedium verdünnt, so daß in jeweils 10 µl, die später in die Kulturen pipettiert wurden, 0,1 - 0,5 µCi enthalten war.

Die Kulturen wurden für einen definierten Zeitraum im Brutschrank bei 37° C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Am Schluß der Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe eines Erntegerätes (Cell Harvester, Flow, Bonn) aus den Kavitäten herausgespült und auf spezielle Glasfasermatten gesaugt. Die Glasfasermatten mit den abgesaugten Zellen wurden 10 min. bei 60° C getrocknet und in einem 5 ml Plastikfläschchen mit 3 ml

Szintillator versetzt. In einem Betacounter (Tricarb 3255, Packard Instruments, Frankfurt) konnte dann die H-3-Aktivität gemessen werden. Die Effizienz der Aktivitätsmessung betrug 24 %.

2.3.6. Auftrennung von B- und T-Zellen

2.3.6.1. Vorbehandlung der Schaferythrozyten für die Rosettierung von T-Zellen

nach: Urbaniak et. al, (19/8), Saxon et al., (1976)

10 ml einer frischen Schafblutkonserve (Code-Nr. 3002, Biologische Arbeitsgemeinschaft, Lich) wurden dreimal mit jeweils 40 - 50 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zentrifugationen wurden 10 min. bei 375 xg und 4° C durchgeführt. Das Erythrozytensediment (ca. 3 - 4 ml) wurde anschließend in 10 ml einer frisch angesetzten AET-Lösung suspendiert und 20 min. bei 37° C vorsichtig geschüttelt. Sofort anschließend wurden die Erythrozyten mit 30 ml kaltem PBS versetzt und viermal mit diesem Puffer gewaschen. Am Schluß wurden die Zellen zu 10 % (bezogen auf das Volumen des Erythrozytensediments) in Kulturmedium aufgenommen. Die präparierten Zellen wurden maximal zwei Tage bei 4° C aufbewahrt. Sie wurden vor Gebrauch zweimal mit Kulturmedium gewaschen.

2.3.6.2. Rosettierung von T-Zellen

Frisch isolierte PBL eines Spenders (ca. 2×10^8 Zellen) wurden zu 1×10^7 /ml in 20 ml Kulturmedium suspendiert und für eine Stunde bei 37° C in einer 250 ml Gewebekulturflasche inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenenten Lymphozyten dekantiert und mit 20 ml Kulturmedium vorsichtig abgespült. Die Lymphozyten wurden abzentrifugiert und auf 1×10^7 /ml in Kulturmedium eingestellt. Diese Suspension wurde mit dem gleichen Volumen 2 % (v/v) AET-behandelter Schaferythrozyten (AET-SE) vermischt.

Je 5 ml dieser Mischung wurden in einem 50 ml Plastikröhrchen unter leichtem Schütteln 5 min. bei 60 xg (4° C) zentrifugiert. Ohne das Sediment aufzuwirbeln wurden die Röhrchen anschließend für 60 min. bei 0 - 4° C inkubiert. Durch vorsichtiges Drehen der Röhrchen wurden dann die Sedimente suspendiert. Das Volumen wurde mit Kulturmedium auf 15 ml je Röhrchen ergänzt, und die Rosettenbildung konnte mikroskopisch begutachtet werden.

2.3.6.3. Depletion der Rosetten-bildenden T-Zellen

Die nach der Rosettierung resultierende Zellsuspension wurde mit kaltem RPMI und 10 % FCS auf 15 ml pro 50 ml Röhrchen verdünnt. Mit Hilfe einer Spritze wurden jeweils 10 ml des Ficoll-Metrizooat Trennmediums (Dichte: 1,077 g/ml) unter die Suspension geschichtet.

Zunächst wurden die Röhrchen 10 min. bei 60 xg und sofort anschließend 25 min. bei 375 xg zentrifugiert. Die weißliche Zwischenschicht über dem Trennmedium enthielt die von T-Zell-Rosetten depletierten Lymphozyten.

Sie wurden mit einer Spritze abgesaugt und zweimal mit kaltem RPMI gewaschen. In den meisten Fällen wurde die Rosettierungsdepletion wiederholt. Die Lymphozyten wurden dann zu $1 - 2 \times 10^6$ /ml in RPMI und 10 % FCS suspendiert und in Gewebekulturflaschen über Nacht im Brutschrank inkubiert (37° C, 5 % CO₂). Die nicht-adhärenenten Zellen der Gewebekulturflaschen wurden nach der Inkubation dekantiert, abzentrifugiert und einer zweiten Rosettierungsdepletion mit AET-behandelten Schaferythrozyten unterworfen.

2.3.7. Produktion Lymphokin-haltiger PBL-Überstände

2.3.7.1. ConA-Sepharose induzierte PBL-Überstände (CASS)

Die kommerziell erhältliche ConA-Sepharose wurde für die Induktion von Lektin-freien Überständen benutzt. Das Gel wurde mindestens viermal in RPMI gewaschen und anschließend noch dreimal in Kulturmedium gewaschen. Frisch isolierte PBL wurden in einer Dichte von 3×10^6 /ml zusammen mit 5 % Gelvolumen ConA-Sepharose in Kulturmedium angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37° C in Gewebekulturflaschen. Nach 24 h wurden die Kulturen abzentrifugiert (10 min., 170 xg). Der Überstand wurde dann durch eine weitere Zentrifugation (30 min., 1000 xg) von kleineren Partikeln befreit. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde sterilfiltriert und portioniert bei -20° C eingefroren. In den weiteren Ausführungen wurden diese Überstände mit der Abkürzung CASS oder CAS-Sup (ConA-Sepharose-Supernatant) bezeichnet.

2.3.7.2. PWM induzierte PBL-Überstände

Für die Induzierung von B-Zell-differenzierenden Lymphokinen wurden frisch isolierte PBL in einer Dichte von 3×10^6 /ml in Kulturmedium unter dem Zusatz von 2 µg PWM/ml für 24 h in Gewebekulturflaschen inkubiert. Wie oben unter 2.3.7.1. beschrieben, wurde der Überstand der Zellen gewonnen und eingefroren. Die Bezeichnung für diese Überstände in späteren Ausführungen ist PWM-Sup (PWM-Supernatant).

2.3.8. Fixierung von ConA-Sepharose mit Glutaraldehyd

Die kommerziell erhältliche ConA-Sepharose wird vom Hersteller durch Kopplung von ConA an Bromcyan-aktivierte Sepharose produziert. Das ConA ist über eine kovalente Bindung mit der Sepharose verbunden. Da jedoch das ConA aus mehreren Untereinheiten besteht, ist bei bestimmten pH-Werten (unter 6,8) eine Desaggregation möglich, so daß

freie ConA-Untereinheiten in Lösung gehen können. Um die ConA-Sepharose zu stabilisieren, wurden die ConA-Untereinheiten durch Glutaraldehyd-Behandlung fixiert, ohne daß die mitogene Aktivität der ConA-Sepharose aufgehoben wird. Die Methode der Fixierung von Protein-Sepharose-Konjugaten wurde nach den Arbeiten von Kowal und Parsons (1980) durchgeführt.

10 ml ConA-Sepharose-Gel wurde zweimal mit dem vierfachen Volumen Karbonatpuffer gewaschen (alle Zentrifugationen: 100 xg; 10 min.) und über Nacht im Karbonatpuffer äquilibriert. Danach wurde das Gel in 40 ml frischem Karbonatpuffer suspendiert und mit 40 µl Glutaraldehyd (50 %ig) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h unter leichter Rotationsbewegung (100 RPM) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gel abzentrifugiert und die Fixierung durch Zugabe von 40 ml Tris/HCl-Puffer gestoppt. Nach 1 h Inkubation (Raumtemperatur) wurde der Tris/HCl-Puffer durch 1 m NaCl-Lösung ersetzt und in der gleichen Lösung zweimal gewaschen. Am Schluß wurde das Gel noch dreimal mit Kulturmedium gewaschen und bis zur Verwendung bei 4° C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die fixierte ConA-Sepharose noch weitere dreimal mit Kulturmedium gewaschen.

2.3.9. Messung der TCGF-Aktivität

2.3.9.1. Kultivierung von TCGF-abhängigen T-Zellen

Frisch isolierte PBL (3×10^6 /ml) wurden in Kulturmedium unter dem Zusatz von Phytohämagglutinin (1 µg/ml) kultiviert. Die Kultur hatte ein Volumen von 15 - 20 ml und wurde in 250 ml Gewebekulturflaschen durchgeführt. Nach drei Tagen wurden die aktivierten Zellen durch Zentrifugation (200 xg, 10 min.) vom alten Medium befreit und in einer Dichte von 1×10^6 /ml in frischem Kulturmedium suspendiert. Die Zellen erhielten einen 20 %igen Zusatz von TCGF-haltigen Lymphocult (Fa. Biotest, Frankfurt). Wie beschrieben, wurde das Medium und Lymphocult alle zwei bis drei Tage ersetzt.

2.3.9.2. Isolierung von T-Zellblasten

Nach vier bis fünf derartigen Passagen (ca. 10 - 14 Tage) wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Die durch die PHA-Aktivierung entstandenen T-Zellblasten wurden mit Hilfe einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation wie folgt isoliert. Das Zellsediment wurde in 2 ml kaltem, isotonem 100 % Percoll aufgenommen. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit Kanüle (Nr. 16) wurden die Zellen in einem konischen 15 ml Röhrchen vorsichtig suspendiert. Diese Suspension wurde sukzessiv mit je 2 ml abnehmender Percollverdünnung überschichtet (60, 50, 40, 30 % Percoll und RPMI, s. Abb. 6).

Der Percollgradient wurde bei 4° C 15 min. mit 400 xg zentrifugiert. Die resultierende Blastenschicht zwischen 30 und 40 % wurde vorsichtig abgesaugt und mit kaltem Kulturmedium zweimal gewaschen. Die gewonnenen Zellen wurden im gleichen Medium suspendiert, gezählt und auf $2 - 3 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

2.3.9.3. Testansatz für die TCGF-Messung

In einer 96 Lochplatte wurden 50 µl dieser Zellsuspension je Kavität mit 50 µl Testfaktor versetzt. Als positive Kontrolle diente eine logarithmische Verdünnungsreihe (1 : 2 bis 1 : 2048) von Lymphocult. Negative Kontrollen waren Kulturmedium, ConA (0,5, 1,0, 2,0 µg/ml) und PHA (0,5, 1,0, 2,0 µg/ml). Die Proben wurden meist unverdünnt angelegt.

Nach 48 h Inkubation bei 37° C wurde den Kulturen für weitere 16 - 20 h H-3-Thymidin (0,5 µCi) in 10 % zugesetzt. Der Thymidineinbau der T-Zellblasten wurde dann, wie bereits beschrieben, gemessen (s. 2.3.5.2.).

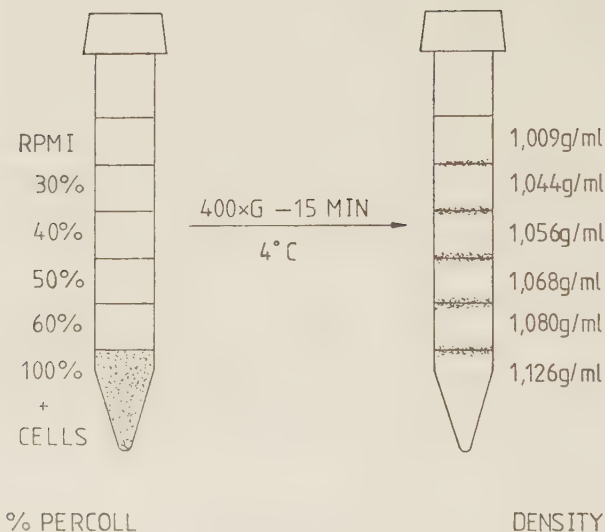


Abb. 6: Isolierung von Lymphoblasten im diskontinuierlichen Dichtegradienten

$1 - 2 \times 10^7$ Zellen wurden in 2 ml 100 % isotonischem Percoll suspendiert und in 12 ml Zentrifugenröhrchen mit je 2 ml Percollverdünnung abnehmender Konzentration und zuletzt mit RPMI überschichtet. Die Dichte dieser Schichten ist rechts angegeben. Nach der Zentrifugation konnten die Zellpopulationen entsprechend ihrer Dichte aus den einzelnen Zwischenschichten isoliert werden und durch mehrfaches Waschen vom Percoll befreit werden.

2.3.10. Messung von B-Zellfaktoren

Die Messung der Proliferation und der Ig-Produktion von isolierten B-Zellen wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Wrigley und Choi (1983) durchgeführt.

Als Testzellen wurden B-Zellen benutzt, die durch zwei Rosettierungen mit AET behandelten SRBC von T-Zellen und durch Adhärenz an Plastik und Makrophagen bzw. Monozyten befreit wurden (s. 2.3.7.).

Die isolierten B-Zellen wurden mit abgetöteten und fixierten Staphylococcus aureus (Stamm Cowan I) zu Blasten voraktiviert.

2.3.10.1. Präparation des B-Zell-Aktivators SAC

In Anlehnung an die Arbeiten von Kessler (1975) sowie Saiki und Ralph (1981) wurde für die Aktivierung der B-Zellen ein SAC-Präparat (Pansorbin, Fa. Calbiochem) benutzt, das vor Gebrauch mit Formaldehyd nachfixiert wurde.

Die Fixierung sollte das Ablösen des freien Protein A von der Bakterienzellwand verhindern.

5 ml einer 10 %igen (w/v) Pansorbin-Suspension wurden zweimal in physiologischen PBS gewaschen. Die Zentrifugationen der Bakterien erfolgten jeweils 15 min. bei 8000 xg. Danach wurden die Zellen im ursprünglichen Volumen PBS suspendiert und mit 1,5 % des Volumens Formalin versetzt. Das Gemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur unter kreisförmigen Schwenkbewegungen (100 UPM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min. in einem Wasserbad auf 80° C erhitzt und danach dreimal mit je 30 ml PBS gewaschen. Die Konzentration wurde am Schluß auf 10 % (w/v) eingestellt. Die fixierten Zellen wurden bei 4° C aufbewahrt.

2.3.10.2. Aktivierung der B-Zellen

B-Zellen, die durch zwei Rosettierungen von T-Zellen befreit worden waren, wurden in einer Dichte von etwa 2×10^6 /ml in Kulturmedium suspendiert. Die Suspension wurde mit SAC versetzt, so daß die SAC-Konzentration 0,01 % (w/v) in der B-Zellkultur betrug. Die Kultur wurde zu je 5 ml in einer 50 ml Kulturflasche für 48 h kultiviert.

2.3.10.3. Isolierung der B-Zellblasten

Nach der Aktivierung der B-Zellen wurde die Kultur abzentrifugiert (170 xg, 10 min.) und einmal mit Kulturmedium gewaschen. Das Sediment wurde dann in isotonischem, 100 % Percoll (Pharmacia, Freiburg) mit Hilfe einer 1 ml Spritze (+ Kanüle Nr. 16) vorsichtig suspendiert, um die Blasten zu vereinzeln. In einem konischen 15 ml Röhrchen wurde diese Suspension mit je 2 ml einer abfallenden Konzentrationsreihe von Percoll (60, 50, 40, 30 % Percoll und RPMi) überschichtet (s. Abb. 6). Das Röhrchen wurde anschließend 15 min. bei 400 xg zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die Zellschichten zwischen den einzelnen Percolldichten mit einer Spritze (1 ml) isoliert, abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Die voluminösen Blasten zeigten sich vorzugsweise in der Schicht zwischen 50 und 40 % Percollverdünnung. Die Blasten waren in dieser Schicht frei von sogenannten Ghosts (Zelleichen) und kleinen Zellen unter 10 µm Durchmesser. Das Ergebnis einer Blastenisolierung ist in der Tab. 7 dargestellt.

2.3.10.4. Messung des Faktor abhängigen Thymidineinbaus (BCGF-Messung)

Die isolierten Blasten wurden in Kulturmedium suspendiert und in die Wells von 96 Lochplatten verteilt. Die Zelldichte wurde so eingestellt, daß in jedem Well 1 - 5×10^4 -Blasten enthalten waren. Je nach Ansatz wurden ein oder mehrere Fak-

toren mit dem jeweiligen Volumen von 50 μ l zu der Kultur gegeben. Das Gesamtvolumen der Kultur betrug 150 μ l. H-3-Thymidin wurde in der Regel nach 48 h für weitere 12 h hinzugegeben (0,5 μ Ci in 10 μ l für jedes Well). Bei der Messung wurde in jedem Ansatz als positive Kontrolle ein PWM-Sup (Kulturüberstand von 2 μ g PWM/ml aktivierten 3×10^6 PBL/ml für 24 h inkubiert) und mehrere negative Kontrollen (Kulturmedium, 2 μ g PWM/ml, 3 μ g ConA/ml) analog zu den Faktoren eingesetzt.

3. Resultate

3.1. Spezifität des Radioimmunoassays

Das wichtigste Meßverfahren der vorliegenden Arbeit war die Konzentrationsbestimmung der vier Immunglobulinklassen IgM, IgG, IgA und IgE. Der Empfindlichkeitsbereich sollte für die Messung von neu gebildeten Immunglobulinen in Lymphozytenkulturen geeignet sein. Auf der anderen Seite mußte das Verfahren eindeutig die verschiedenen Isotypen unterscheiden können.

Aus diesem Grunde wurde zunächst das Ausmaß der Kreuzreaktionen im RIA bestimmt. Hochreine Immunglobulinstandards, die aus monoklonalen Zelllinien gewonnen waren, wurden zu je 100 ng/ml in den vier verschiedenen RIAs eingesetzt und gemessen. Das Ergebnis dieser Austestung ist in der Tab. 4 dargestellt. Die Werte der Tab. 4 geben die scheinbaren Konzentrationen in ng/ml an, die im jeweiligen RIA über eine Standardkurve errechnet wurden.

Es ergab sich, daß der IgE- und IgM-RIA hochspezifisch waren. Die jeweils anderen Isotypen verursachten in dem betreffenden Meßbereich keine Kreuzreaktion. Bei den meisten Proben, die später im IgE-RIA gemessen wurden, bestätigte sich die hohe Spezifität. Proben mit einem IgG-Gehalt über 1000 ng/ml zeigten im IgE-RIA keine meßbaren Konzentrationen über 0,2 ng/ml. Eine geringe Kreuzreaktion ist für IgM im IgA-RIA und für IgA im IgG-RIA zu verzeichnen. Die Kreuzreaktionen liegen hier aber unter 5 %, d. h. die 100 ng-Standards werden mit einer geringeren Konzentration als 5 ng/ml im kreuzreagierenden RIA gemessen.

Tab. 4: Spezifität der isotypenspezifischen RIAs

monoklonaler 100 ng/ml-Standard	IgM-RIA (ng/ml)	IgG-RIA (ng/ml)	IgA-RIA (ng/ml)	IgE-RIA (ng/ml)
IgM	114,8 ($\pm$ 8,7)	< 0,2	4,9 ($\pm$ 1,1)	< 0,2
IgG	< 0,2	97,2 ($\pm$ 8,3)	< 0,5	< 0,2
IgA	< 0,2	2,1 ($\pm$ 0,2)	100,8 ($\pm$ 7,1)	< 0,2
IgE	< 0,2	< 0,2	< 0,5	98,7 ($\pm$ 11,5)

Monoklonale Immunglobulinstandards wurden in einer Konzentration von 100 ng/ml in den isotypenspezifischen RIAs gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte von Triplikaten und ihre Standardabweichungen.

3.1.1. Die Meßgrenze und Genauigkeit des RIAs

Für die Messung des IgE in Überständen von PBL-Kulturen ist der Meßbereich unter 1000 pg/ml wichtig. Dieser Bereich einer typischen RIA-Eichkurve wird in der Abb. 7 dargestellt. Eine Kurvenanpassung wurde, wie bereits unter Material und Methoden beschrieben, nach der logit/log-Funktion berechnet. Typisch für den Verlauf der Eichkurve ist der zunächst langsame Anstieg im unteren Meßbereich. In diesem flachen Bereich der Kurve macht sich ein Meßfehler stärker bemerkbar als im Bereich des steilen Anstiegs. Am Beispiel des Zählfehlers, der durch die Aktivitätsmessung verursacht wird, soll der Zusammenhang zwischen Fehlerbreite und Meßbereich demonstriert werden. Bei dieser theoretischen Betrachtung wurde der mögliche Pippettierfehler nicht berücksichtigt. Der Zählfehler s der Aktivitätsmessung mit n "counts" kann nach der Formel $s = \sqrt{n}$ berechnet werden. Bei einer Meßzeit von einer Minute ist n mit der cpm-Zahl identisch.

In der Abb. 7 ist der Fehler s durch senkrechte Balken angedeutet. Wenn dieser Fehler über die Eichfunktion in IgE-Konzentrationen umgerechnet wird, kann die Fehlerbreite für die verschiedenen Konzentrationen prozentual angegeben werden. In der Abb. 8 ist dieser Zusammenhang dargestellt. Sie zeigt den prozentualen Fehler abhängig vom Meßbereich an. Bei 61 pg/ml liegt der Fehler noch bei 87 % und erreicht bei 200 pg/ml etwa 15 %. Diese Beziehung macht allein den Fehler der Aktivitätszählung deutlich und stellt sicherlich nur die minimale Fehlerbreite dar. Die Pipettierfehler der RIA-Durchführung sowie die Fehler der Kultivierungsansätze vergrößern den tatsächlichen Fehler. Diese Fehler wurden in den folgenden Abbildungen meist durch die berechnete Standardabweichung der Parallelen dargestellt.

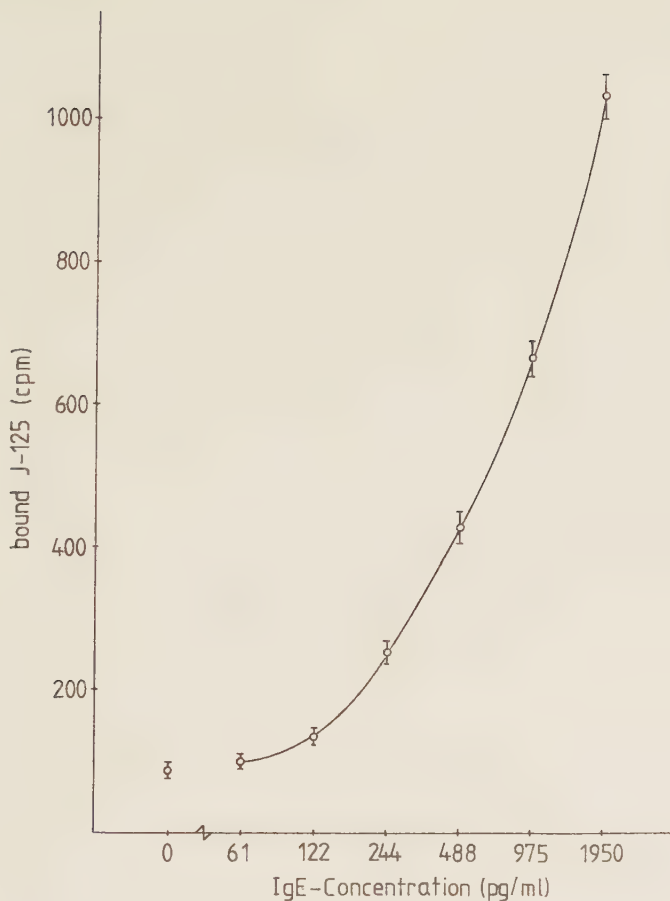


Abb. 7: Unterer Meßbereich eines IgE-RIA

Eingezeichnet sind die originalen cpm-Werte im unteren Meßbereich eines exemplarischen IgE-RIA. Die theoretischen Standardabweichungen ($s = n^{0,5}$) der Radioaktivitätsmessung mit einer Meßzeit von einer Minute sind als senkrechte Balken angedeutet. Die Nachweisgrenze für IgE lag etwa bei 200 pg/ml.

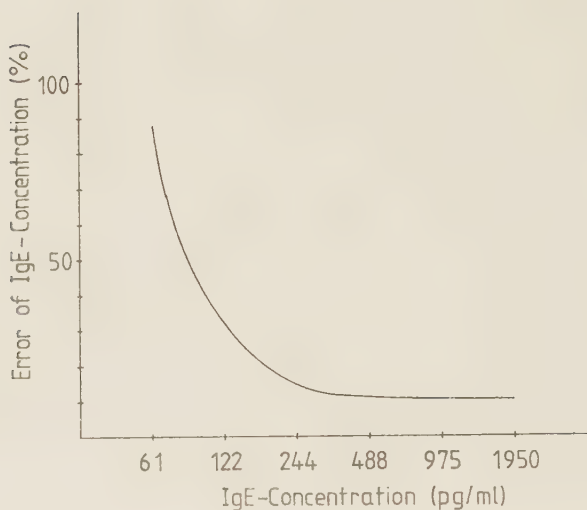


Abb. 8: Abhängigkeit des theoretischen Meßfehlers vom Meßbereich im IgE-RIA

Dargestellt ist der prozentuale Fehler einer IgE-Messung, der sich theoretisch allein aus dem Zählfehler ergeben kann. Er ergab sich aus der Berechnung der Zählfehlerbreite (s. Abb. 7) mit Hilfe der Eichfunktion. Aus der Abbildung kann die maximal mögliche Genauigkeit des IgE-RIA bei niedrigen Konzentrationen abgelesen werden. An der Meßgrenze von 200 pg/ml beträgt dieser Fehler 10 - 15 %.

3.2. Die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion

Um die PWM induzierte Immunglobulinproduktion zu messen, mußten zunächst die Parameter der Lymphozytenkultur optimiert werden. Als erstes wurde der zeitliche Verlauf der Immunglobulinproduktion durch die Messung der Ig-Konzentrationen in den Kulturüberständen verfolgt. Dann wurden die optimalen PWM-Konzentrationen bestimmt. Außerdem wurde der Einfluß der Zelldichte auf die PWM induzierte Immunglobulinproduktion untersucht. Das Augenmerk der Untersuchungen lag auch auf den isotypenspezifischen Reaktionen. Besonders die IgE-Produktion sollte dabei beachtet und mit der IgG- bzw. IgM-Produktion verglichen werden. Die widersprüchlichen Berichte der Literatur über eine PWM induzierbare IgE-Produktion wurden unter anderem an einem Kollektiv allergischer Patienten überprüft.

3.2.1. Zeitkinetik

Eine wichtige Frage war der zeitliche Verlauf der Immunglobulinproduktion in den PBL-Kulturen. Das Meßverfahren bestand darin, Kulturen nach einer gewissen Zeit im Brutschrank abzentrifugieren, die Überstände zu ernten und bis zur Messung bei -20°C einzufrieren. Die Messung der Konzentrationen in den Überständen gab also die Menge der über den betreffenden Zeitraum produzierten Immunglobuline der Kultur wieder. Durch die Aufnahme einer Zeitkinetik sollte der dynamische Prozeß der Produktion verfolgt werden. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche PWM-Konzentrationen bzw. PWM-freie Mediumkontrollen den PBL-Kulturen angeboten. Die Zellen wurden zunächst in einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in die Kultur gegeben. Diese Zelldichte wurde in unterschiedlichen Arbeiten gefunden und wurde zur Orientierung benutzt. Die Ergebnisse des beschriebenen Experimentes sind in der Abb. 9 wiedergegeben. Die auf der x-Achse eingezeichneten Zeiten geben den Tag der Kultivierung an, an dem die

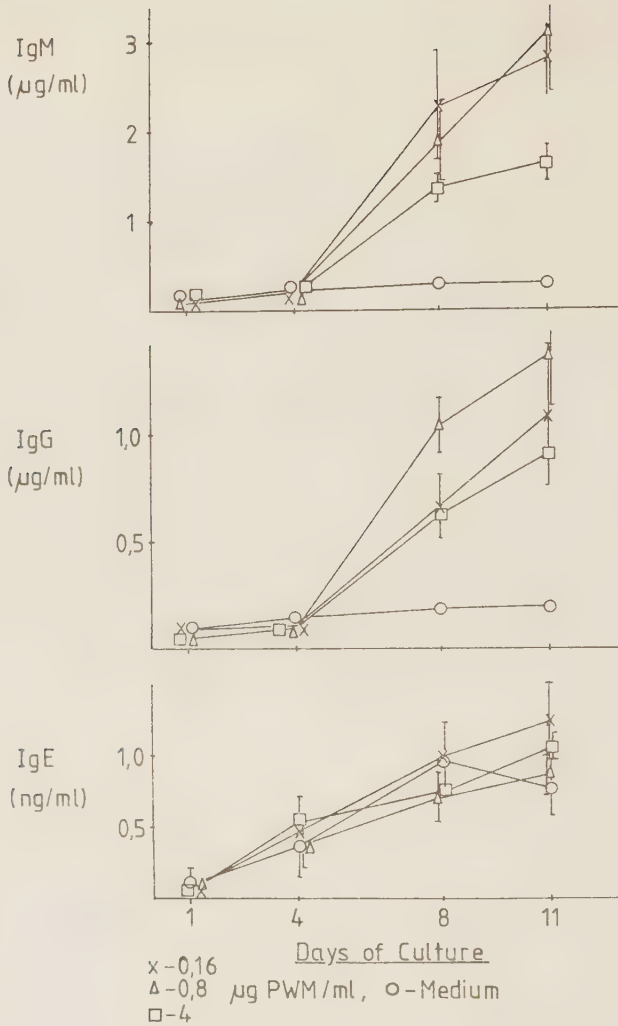


Abb. 9: Zeitkinetik einer PWM-stimulierten Immunglobulinproduktion

1×10^6 PBL/ml wurden in 1,5 ml Kulturen in 24-Lochplatten für die angegebenen Zeiten mit den angegebenen PWM-Konzentrationen kultiviert. Durch Zentrifugation wurden die Überstände gewonnen, eingefroren und im RIA bestimmt. Die Kulturen wurden im Triplikate angelegt, die jeweiligen Überstände wurden im Duplikat gemessen. Aus den sich ergebenden sechs Werten wurde der Mittelwert berechnet. Die Standardabweichung wurde als senkrechter Balken angedeutet.

Überstände geerntet wurden. Bei der IgG- und der IgM-Produktion wurde der Effekt der PWM-Zugabe deutlich. Zwischen dem vierten und achten Tag stiegen die Mengen des gebildeten IgG und IgM drastisch an und nahmen bis zum elften Tag weiter zu. In der PWM-freien Kontrolle war kein vergleichbarer Anstieg zu beobachten und zeichnete sich durch eine langsame und stetige Zunahme aus. Der Kurvenverlauf in den ersten vier Tagen ist sowohl in der Anwesenheit als auch in der Abwesenheit von PWM nahezu gleich. Erst danach unterscheidet sich die PWM-Kultur von der Kontrollkultur. Durch diesen Kurvenverlauf wird eine Anlaufphase für die IgG- bzw. IgM-Produktion dokumentiert.

Ein ähnlicher Verlauf der Ig-Produktion wurde bei zahlreichen Versuchen auch für IgA demonstriert (in der Abbildung nicht gezeigt). Völlig anders verhielt sich die IgE-Produktion. Hier war kein stimulierender Effekt durch PWM zu beobachten. Die Menge des gebildeten IgE nahm über die Zeit ständig zu, PWM hatte in dieser Versuchsanordnung die IgE-Produktion nicht stimuliert. Nicht bei allen Wiederholungen dieses Versuches konnte überhaupt eine IgE-Produktion gemessen werden. Die Werte für das IgE lagen in den Fällen unter der Meßgrenze von 50 - 200 pg/ml. Die Unterschiede zwischen den gemessenen Isotypen bestanden:

1. in der absoluten Menge der neu gebildeten Immunglobuline, sie sind aus der Abbildung ersichtlich, sie waren bei Wiederholungen aber nur in den Größenordnungen ähnlich,
2. in der Stimulierbarkeit der Produktion durch PWM.

Die Dynamik der IgG- und IgM-Produktion machte deutlich, daß es sich um einen Prozeß handeln mußte, der einer gewissen Aktivierungsphase benötigte, um die Immunglobuline neu zu bilden. Für weitere Experimente ohne die Messung einer Zeitkinetik wurden deshalb die Kulturüberstände meist am siebten Tag geerntet.

3.2.2. Einfluß der Zelldichte auf die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion

Wie bereits erwähnt, war die Zelldichte des vorhergehenden Experiments aus der Literatur übernommen worden. In einigen Experimenten zeigten sich jedoch keine einheitlichen Ergebnisse in der Stimulierbarkeit der IgM- und IgG-Produktion. In manchen Fällen blieb die Stimulation aus. Aus diesem Grund wurden verschiedene Parameter der Kultur variiert, im vorliegenden Experiment die Zelldichte. Daneben wurde der spenderspezifische Einfluß untersucht. Zwei Beispiele werden in der Abb. 10 demonstriert.

Für die Durchführung der Kulturversuche wurden die peripheren Blutlymphozyten der Spender in der Dichte von 0,5-, 1,0- und $2,0 \times 10^6$ /ml in der Kultur eingesetzt. Verschiedene PWM-Konzentrationen bzw. Kulturmedium als Kontrolle wurden zugegeben. Die Überstände dieser Kulturen wurden nach sieben Tagen geerntet. Die Konzentrationen der Immunglobuline wurden im RIA bestimmt. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in der Abb. 10 am Beispiel der IgG-Produktion dargestellt.

Bei der spontanen Produktion, d. h. in der Abwesenheit von PWM, zeigte sich bei beiden Spendern eine nahezu proportionale Zunahme der IgG-Produktion abhängig von der Zellkonzentration. Das Ausmaß der spontanen Produktion war jedoch spenderabhängig unterschiedlich hoch. In der Abb. 10 ist im Experiment 1 eine relativ schwache, im Experiment 2 hingegen eine relativ starke Spontanproduktion zu beobachten. Die individuellen Eigenschaften der verschiedenen Spender-PBL machen sich also hier in der unterschiedlichen Spontanproduktion bemerkbar. Offensichtlich sind bereits in vivo differenzierte Plasmazellen dafür verantwortlich, die möglicherweise in unterschiedlichen Anteilen an den Gesamtpopulationen präpariert worden waren.

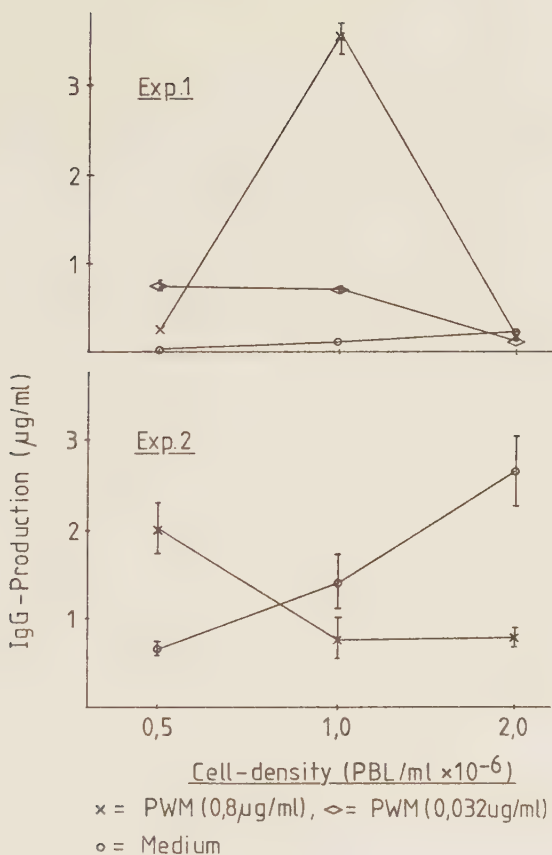


Abb. 10: Abhängigkeit der PWM-stimulierten IgG-Produktion von der Zelldichte

Die Ergebnisse von zwei Experimenten mit den PBL verschiedener Spender sind dargestellt. Die PBL-Kulturen (1,5 ml, 24-Lochplatten) wurden in den angegebenen Dichten für sieben Tage mit oder ohne PWM kultiviert. In den geernteten Überständen wurde IgG bestimmt. Die Kulturen wurden in Triplikaten angelegt, die Überstände in Duplikaten gemessen. Standardabweichungen sind als senkrechte Balken angedeutet.

Das wesentliche Ergebnis der Experimente lag jedoch in der unterschiedlichen Wirkung von PWM bei verschiedenen Zelldichten. PWM konnte die IgG-Produktion sowohl stimulieren als auch inhibieren. Die Stimulierbarkeit der IgG-Produktion fehlte bei den hohen Zelldichten, bei 2×10^6 -Zellen/ml war eine PWM-induzierte Inhibition der spontanen IgG-Produktion zu beobachten. Die nächst niedrige Zelldichte (1×10^6 /ml) zeigte bei den zwei Spendern unterschiedliche Effekte des PWM. Im Experiment 1 war eine Stimulation, im Experiment 2 hingegen eine Inhibition zu sehen. Die Zelldichte $0,5 \times 10^6$ /ml zeigte bei beiden Spendern eine PWM-induzierte Stimulation. Das Ausmaß der Stimulation bei dieser Zelldichte lag im Experiment 1 jedoch unter der Stimulation, die bei 1×10^6 -Zellen/ml zu beobachten war.

Die gezeigten Experimente machen deutlich, daß die Fähigkeit einer PBL-Population, auf einen PWM-Stimulus zu reagieren, sowohl von der Zelldichte als auch von der individuellen Beschaffenheit abhängig ist.

3.2.3. Die Abhängigkeit des PWM-Optimums von der Zelldichte

Im vorhergehenden Experiment ist gezeigt worden, daß die Stimulation der Ig-Produktion (bis auf IgE) durch PWM möglich ist. Um nun den Einfluß der Zelldichte auf die optimale PWM-Konzentration zu untersuchen, wurde PWM über einen weiten Konzentrationsbereich ($0,032 - 20,0 \mu\text{g/ml}$) in verschiedenen dichten PBL-Kulturen eingesetzt. Die Zelldichte betrug $2,0$ -, $1,0$ - und $0,5 \times 10^6$ /ml. Die Überstände der Testkulturen wurden nach sieben Tagen geerntet. Die Ergebnisse der Ig-Messungen sind in den Abbildungen 11 - 13 dargestellt. In diesem Experiment war IgE nicht meßbar, die Konzentrationen lagen unter 50 pg/ml .

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, war in diesem Experiment bei der Zelldichte 2×10^6 /ml keine Stimulation der Ig-Produktion möglich. Im Gegenteil, es zeigte sich eine leichte Inhibition durch PWM (Abb. 11).

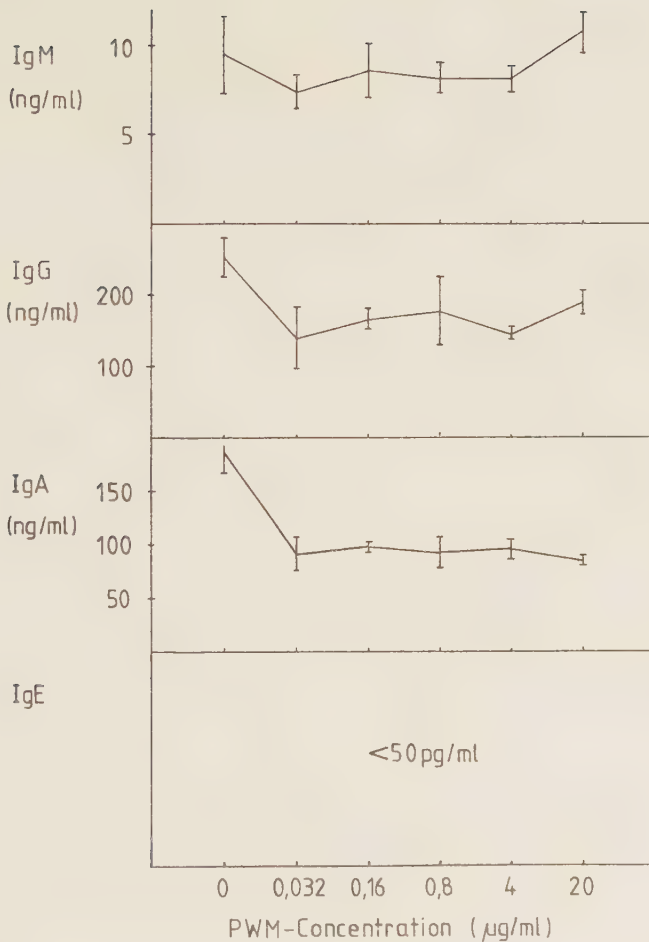


Abb. 11: Die Wirkung von PWM auf eine PBL-Kultur mit einer Dichte von 2×10^6 -Zellen pro ml
 2×10^6 PBL/ml wurde mit PWM der angegebenen Konzentrationen in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) für sieben Tage kultiviert. Die Immunglobuline wurden in den geernteten Überständen im Duplikat gemessen. Standardabweichungen als senkrechte Balken.

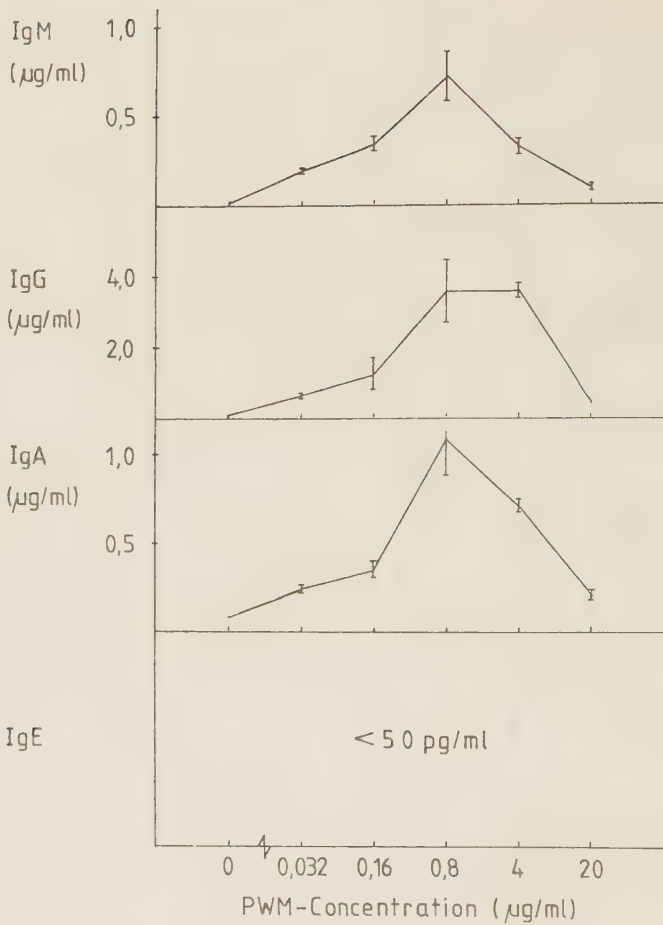


Abb. 12: Die Wirkung von PWM auf eine PBL-Kultur mit einer Dichte von 1×10^6 -Zellen pro ml
Die PBL der gleichen Präparation wie in Abb. 11 wurden in der Dichte $1 \times 10^6/\text{ml}$ kultiviert.
(Legende siehe Abb. 11)

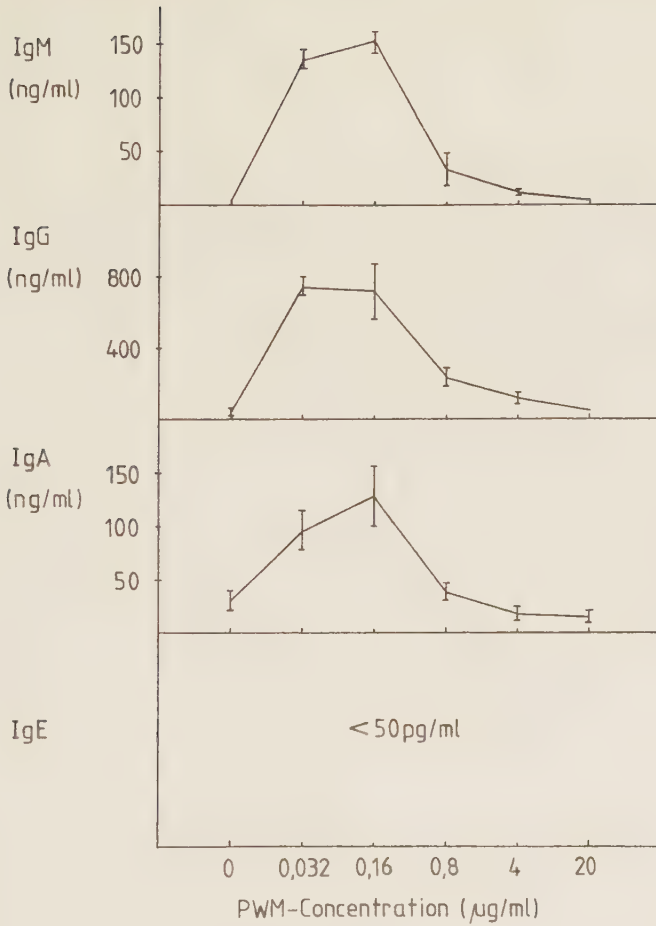


Abb. 13: Die Wirkung von PWM auf eine PBL-Kultur mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$

Die gleichen PBL wie in Abb. 11 und 12 wurden in der Dichte von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ kultiviert.

Die Reduktion der Zelldichte auf die Hälfte ($1 \times 10^6/\text{ml}$) machte dagegen eine starke PWM-Stimulation der Ig-Produktion möglich (Abb. 12). Die optimale PWM-Konzentration bei dieser Zelldichte lag bei $0,8 \mu\text{g}/\text{ml}$. Sie war für die drei meßbaren Immunglobulinklassen IgM, IgG und IgA gleich. Eine weitere Halbierung der Zelldichte auf $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ verschob das PWM-Optimum weiter in kleinere Konzentrationsbereiche (Abb. 13). Das Optimum für die maximale Ig-Produktion lag zwischen $0,032$ und $0,16 \mu\text{g PWM}/\text{ml}$. Ein Vergleich der beiden letzten Zelldichten macht deutlich, daß kein linearer Zusammenhang zwischen PWM-Optimum und Zelldichte vorherrscht. Die Verdoppelung der Zelldichte erhöht das PWM-Optimum um den Faktor 5 - 25. Weiterhin wird gezeigt, daß durch die Verdoppelung der Zelldichte die optimale Immunglobulinproduktion um den Faktor 5 - 9 vergrößert wird. Für die optimale Ig-Produktion wirkt also eine gewisse Zelldichte stimulierend auf die PWM-Aktivierung.

Zusammenfassend macht dieses Experiment deutlich:

1. Die Zelldichte hat einen wesentlichen Einfluß auf das Ausmaß der PWM-induzierten Ig-Produktion. Es gibt eine kritische Zelldichte (hier $2 \times 10^6/\text{ml}$), bei der keine Stimulation mehr möglich ist. Auch eine Erhöhung der PWM-Konzentration auf $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ (der 25fachen Konzentration des Optimums bei der halben Zelldichte) kann keine Stimulation hervorrufen.
2. Unter dieser kritischen Zelldichte ist eine positive Stimulation der Ig-Produktion möglich. Das Ausmaß der Reaktion wird sowohl durch die Zelldichte als auch durch die PWM-Konzentration gesteuert. Eine gewisse Zelldichte mit engeren Zellkontakten ist jedoch für die Stimulierung notwendig.
3. Eine Stimulation der IgE-Produktion ist bei allen Zelldichten und PWM-Konzentrationen nicht möglich.

3.2.4. Die Abhängigkeit der spontanen Immunglobulin- produktion von der Zelldichte und der Kulturdauer

Bei der PWM-aktivierten PBL-Kultur zeigte sich im Fall von IgM, IgG und IgA ein starker Einfluß der Zelldichte auf die Stimulierbarkeit der Ig-Produktion. Ab einer bestimmten Zelldichte ($1 - 2 \times 10^6$ /ml) wurde die Produktion durch PWM nicht mehr stimuliert sondern inhibiert. Bei der PWM-freien Lymphozytenkultur, in der die spontane Ig-Produktion gemessen werden kann, wirkten dagegen die gleichen Zellen nicht inhibierend. Das Experiment, das in der Abb. 14 dargestellt ist, macht deutlich, daß die spontane Ig-Produktion (hier auch für IgE gezeigt) in Abhängigkeit von der Zelldichte nahezu linear ansteigt. Die Freisetzung der Immunglobuline ist anscheinend direkt von der Anzahl Ig-produzierender Plasmazellen abhängig. Eine Inhibition durch die Zelldichte ist in diesen Konzentrationsbereichen nicht zu beobachten. Dieser fehlende Inhibitionseffekt ist auf die Abwesenheit des PWM zurückzuführen. PWM scheint bei den inhibitorischen Zelldichten Suppressionsmechanismen auszulösen, die der Stimulation zur Ig-Freisetzung entgegen wirken. Wie schon im anderen Zusammenhang erwähnt, ist die Spontanproduktion von Immunglobulinen ein Maß für den Anteil der Plasmazellen in der präparierten PBL-Kultur. Die Messung der spontanen Produktion sollte es möglich machen, die aktuelle Ig-Produktionsleistung der peripheren Blutlymphozyten zu erfassen und eventuell Rückschlüsse auf die in vivo-Situation zuzulassen.

Die bereits ausdifferenzierten Plasmazellen in der PWM-freien Kultur sezernieren kontinuierlich Immunglobuline. In der Abb. 15 sind die Meßergebnisse einer Zeitkinetik aufgezeigt. Bis auf IgE steigt die Konzentration der Immunglobuline in den Kulturüberständen mit einer gleichbleibenden Geschwindigkeit an, ohne daß eine dynamische Veränderung der Produktion eintritt. Im Fall der IgE-Produktion konnte jedoch eine Reduktion der IgE-Konzentration im Kulturüber-

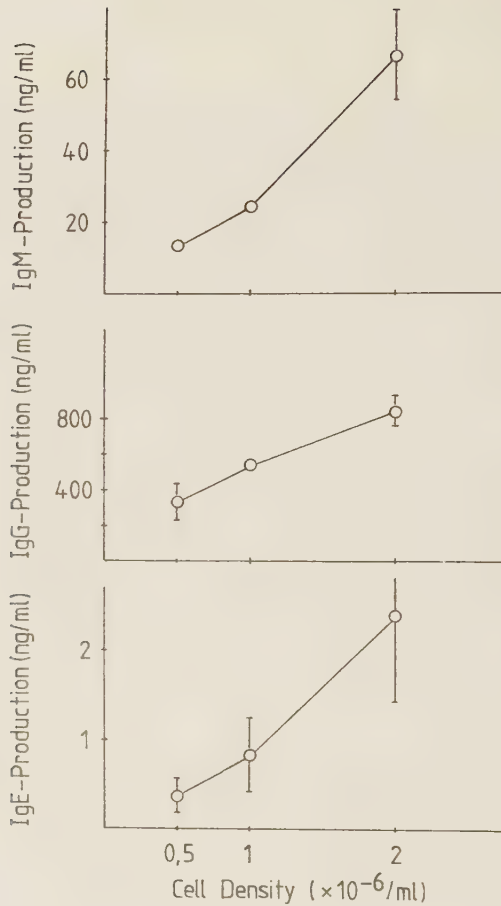


Abb. 14: Die spontane Immunglobulinproduktion in Abhängigkeit von der Zelldichte

PBL-Kulturen wurden mit den angegebenen Zelldichten in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) angelegt. Die Überstände wurden nach sieben Tagen geerntet, eingefroren und in Duplikaten in den entsprechenden RIAs gemessen. Die Zelldichte auf der X-Achse ist linear dargestellt. Senkrechte Balken geben die Standardabweichung an.

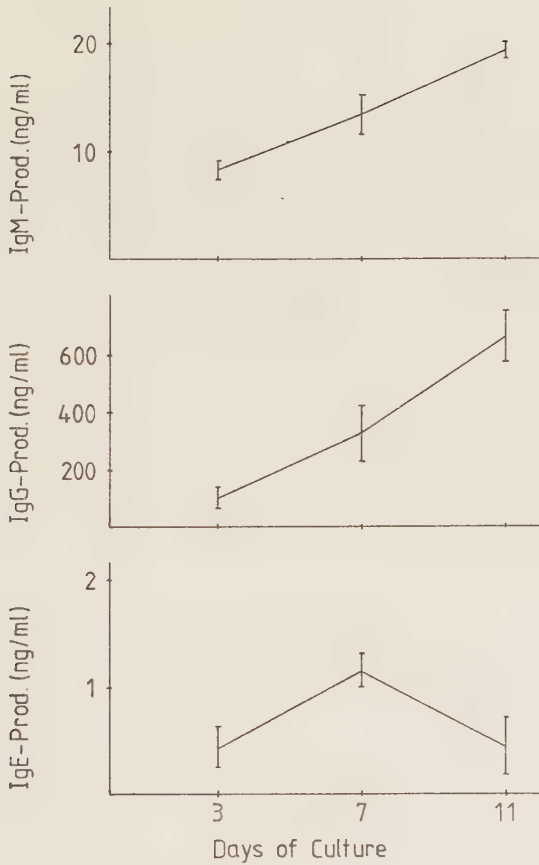


Abb. 15: Die spontane Immunglobulinproduktion in Abhängigkeit von der Kulturdauer

PBL (1×10^6 /ml) wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) mit Kulturmedium ohne PWM-Zusatz für die angegebenen Zeiten (X-Achse) kultiviert. Die Überstände wurden durch Zentrifugation gewonnen und in Duplikaten in den isotypenspezifischen RIAs gemessen. Die senkrechten Balken geben die Standardabweichungen der sechs Meßwerte an.

stand beobachtet werden. Bei mehreren Wiederholungen dieses Experiments war eine solche Reduktion nicht immer zu beobachten. In einem späteren Abschnitt dieser Arbeit wurden die Zeitkinetiken der spontanen IgE-Produktion von einem Kollektiv allergischer Patienten gemessen. Die Reduktion der IgE-Produktion nach sieben bis acht Tagen konnte in einigen Fällen auftreten, eine Regelmäßigkeit konnte dabei jedoch noch dokumentiert werden.

Aus den Experimenten kann geschlossen werden, daß die PBL-Kulturen einen Anteil von Plasmazellen enthalten, die kontinuierlich Immunglobuline sezernieren. Eine Inhibition durch hohe Zelldichten findet nicht statt. Eine Regulation der sezernierenden Plasmazellen ist im Kulturmedium nicht zu beobachten.

3.2.5. Messung der Immunglobulinproduktion von PBL-Kulturen, die mit PWM voraktiviert wurden

In der Literatur gab es Hinweise, daß PWM in einer späten Phase der Lymphozytenkultur T-Suppressorzellen aktiviert, die in der Lage sind, die Immunglobulinproduktion zu inhibieren (Tsokos et al., 1981). Zuraw et al. (1981) konnten durch eine Vorinkubation mit PWM die IgE-Produktion von humanen Lymphozytenkulturen stimulieren. Aus ihrer Sicht wurde durch das Entfernen des PWM nach drei Tagen eine Aktivierung von Suppressorzellen verhindert, die die IgE-Produktion supprimieren können.

Um diese Ergebnisse nachzuvollziehen, wurden bei den folgenden Experimenten Kulturansätze gemacht, in denen das freie PWM nach zwei bis drei Tagen durch Waschen aus der Kultur entfernt wurde. Die frisch isolierten PBL wurden in einer Dichte von $3 \times 10^6/\text{ml}$ zu 20 ml in 250 ml Kulturflaschen mit PWM (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vorinkubiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen abzentrifugiert, dreimal gewaschen und in Kulturmedium suspendiert. Die gewaschenen Zellen wurden dann wie

üblich in 1,5 ml Kulturen (24-Lochplatten) weiterkultiviert. Die Zelldichte wurde auf 1×10^6 /ml eingestellt. Für die Erstellung einer Zeitkinetik wurden die Überstände dieser Kulturen nach unterschiedlichen Zeitintervallen (3 - 11 d) geerntet.

Zunächst wurde der Effekt des PWM in der Vorinkubation untersucht. Die PBL wurden in getrennten Ansätzen mit und ohne PWM inkubiert. Diese vorinkubierten Zellen wurden dann in PWM-freien Kulturmedium weiter inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurden die mit PWM voraktivierten Zellen in 33 % (v/v) des Vorinkubationsüberstandes suspendiert und inkubiert. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Abb. 16 dargestellt. Abgebildet ist die zeitabhängige Immunglobulinproduktion.

Der Effekt der PWM-Vorinkubation gegenüber der Medium-Vorinkubation ist sehr deutlich zu bemerken. Die mit PWM voraktivierten Zellen produzieren in der Nachinkubation auch bei der Abwesenheit von PWM hohe Mengen von IgM und IgG.

Die in PWM-freien Kulturmedium vorinkubierten Zellen produzieren dagegen relativ wenig IgM und IgG. Da beide Kulturen bis auf das PWM gleich behandelt wurden (Waschen, Zentrifugationen etc.), ist der Effekt des PWM eindeutig. Es reicht also eine Vorinkubationsphase von zwei Tagen aus, um die Ig-Produktion zu stimulieren. Die Anwesenheit des PWM-haltigen Vorinkubationsüberstandes reduzierte die Ig-Produktion mehr oder weniger. Am deutlichsten war die Suppression bei der IgG-Produktion. Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Effekte beziehen sich auf die IgM- und IgG-, aber nicht auf die IgE-Produktion. Auch bei mehr als drei Wiederholungen dieses Experimentes konnten keine Effekte hinsichtlich einer PWM-induzierten IgE-Produktion beobachtet werden. Die suppressierenden Effekte des PWM-haltigen Vorinkubationsüberstandes waren entweder auf das PWM oder auf neu generierte Suppressor-faktoren der aktivierten PBL-Kultur zurückzuführen. In einem

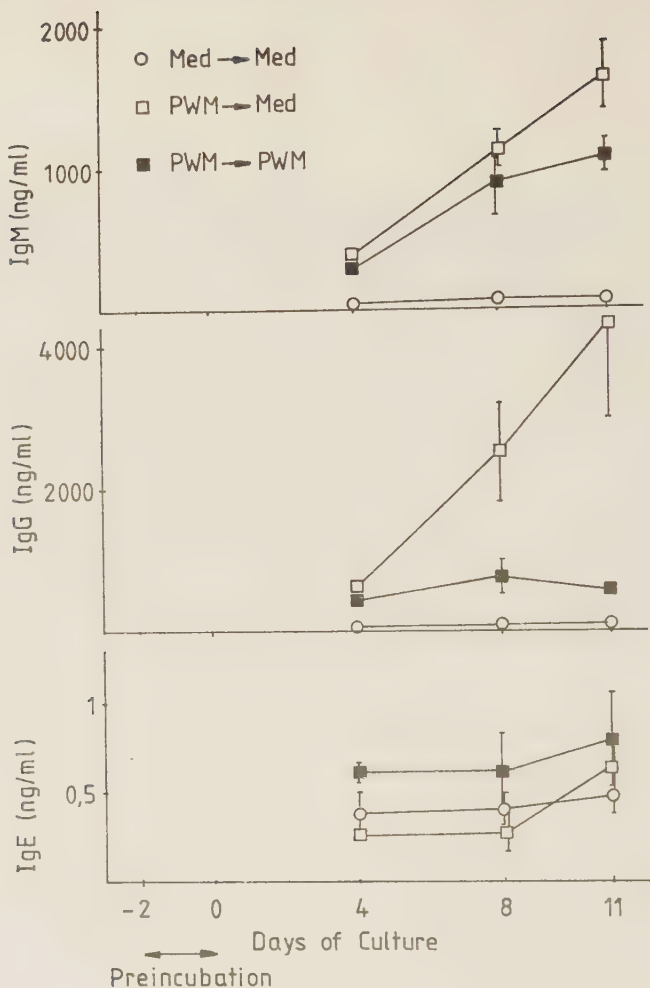


Abb. 16: Effekt einer PWM-Voraktivierung auf die Ig-Produktion von PBL

PBL (3×10^6 /ml) wurden mit oder ohne PWM (2 μ g/ml) in Flaschen für zwei Tage inkubiert, dann dreimal gewaschen und in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten, Dichte: 1×10^6 /ml) für die angegebenen Zeiten (X-Achse) mit oder ohne PWM-Vorinkubationsüberstand (33 % v/v) weiterinkubiert. Die geernteten Überstände wurden in Duplikaten in den entsprechenden RIAs gemessen. Die Standardabweichungen sind als senkrechte Balken dargestellt.

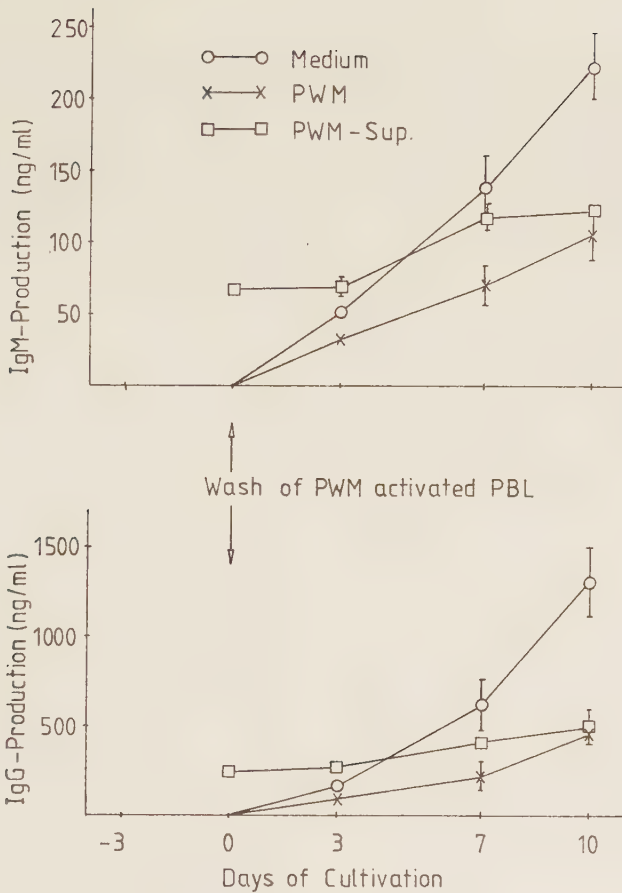


Abb. 17: Effekt von PWM auf voraktivierte PBL

PBL (3×10^6 /ml) wurden mit PWM ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) für drei Tage vorinkubiert, mehrfach gewaschen und in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) mit frischem PWM ($0,67 \mu\text{g}/\text{ml}$), in 33 % (v/v) PWM-Vorinkubationsüberstand und in Kulturmedium für die angegebenen Zeiten (X-Achse) weiterkultiviert. Die Überstände wurden abzentrifugiert, eingefroren. Die Immunglobulinkonzentrationen wurden in den entsprechenden RIAs gemessen.

weiteren Experiment wurde deshalb der Einfluß des PWM-haltigen Überstandes bzw. mit frischem PWM versetzten Kulturmediums auf die weitere Kultur verglichen. Die dargestellte Zeitkinetik der Ig-Produktion (Abb. 17) macht deutlich, daß auch frisches PWM die Suppression der Ig-Freisetzung auslösen kann.

3.3. Weitere Versuche einer IgE-Stimulation

3.3.1. Der Einfluß von Propranolol auf die PBL-Kultur

Die vorangegangenen Experimente zeigten, daß in der PBL-Kultur eine deutliche Stimulierung der IgM-, IgG- und IgA-Produktion durch eine PWM-Aktivierung möglich ist. Eine Stimulierung der IgE-Produktion war dagegen nicht meßbar. Einem Hinweis aus der Literatur zufolge, war der Beta-Rezeptorenblocker Propranolol in der Lage, die IgE-Produktion menschlicher Lymphozytenkulturen erheblich zu steigern (Hovmark et al., 1981). Im folgenden Experiment wurde deshalb Propranolol in der Lymphozytenkultur eingesetzt. Kombiniert wurden verschiedene Propranolol-Konzentrationen (s. Abb. 18) mit einer Verdünnungsreihe von PWM bzw. Medium. Im Überstand wurde die IgM-, IgG- und IgE-Konzentration nach sieben Tagen Kultur gemessen. In einem anderen Experiment wurde am dritten Tag zusätzlich der Thymidineinbau bestimmt (4 h, 0,2 µCi H-3-Thymidin, s. Abb. 19).

In beiden Experimenten, wie auch in drei weiteren nicht gezeigten Experimenten, konnte Propranolol in den verwendeten Konzentrationen (2-, 10-, und 50 µg/ml) keinen steigernden oder hemmenden Einfluß auf die IgE-Produktion ausüben. Auch die Kombination mit den PWM-Verdünnungen zeigte keinen Effekt. Im Thymidineinbau war in der Abwesenheit von PWM eine Hemmung des spontanen Einbaus zu verzeichnen. Beim Zusatz von PWM zeigte sich ein synergistischer Effekt bei der suboptimalen PWM-Konzentration von 0,16 µg/ml und 10 µg/ml Propranolol. Dieser Effekt kann durchaus auf die Inhibition von Suppressorzellen durch Propranolol zurückzuführen sein, wie es von den Autoren Hovmark et. a. (1981) behauptet wurde.

Auch in der IgG-Produktion (Abb. 18) kann ein synergistischer Effekt des Propranolols und des PWM beobachtet werden.

2 µg/ml Propranolol steigern die PWM-induzierte IgG-Produktion um 20 - 70 %. Höhere Propranolol-Konzentrationen inhibieren dagegen die PWM-induzierte IgG-Produktion. Die IgM-Produktion ließ sich durch Propranolol überhaupt nicht stei-

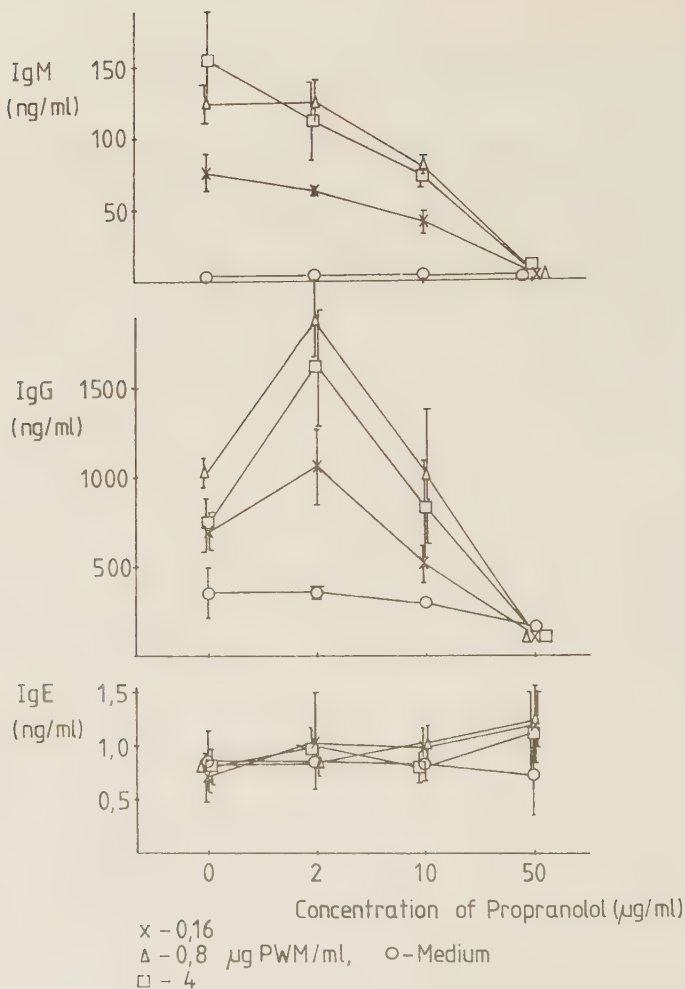


Abb. 18: Einfluß von Propranolol auf die PWM-induzierte IG-Produktion

PBL (1×10^6 /ml) wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) mit verschiedenen Propranolol-Konzentrationen und PWM-Konzentrationen für sieben Tage kultiviert. Die Überstände wurden durch Zentrifugation geerntet und in Duplikaten in isotypenspezifischen RIAs gemessen. Die Standardabweichung wird durch die senkrechten Balken angedeutet.

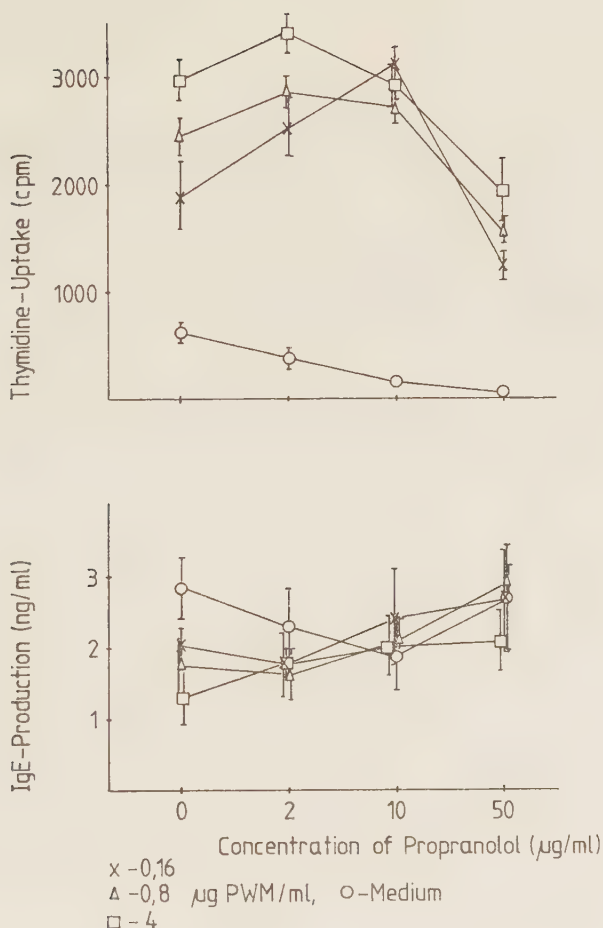


Abb. 19: Einfluß von Propranolol auf den Thymidineinbau und die IgE-Produktion

PBL (1×10^6 /ml) wurden in 1,5 ml Kulturen mit den angegebenen Propranolol-Konzentrationen und PWM-Konzentrationen kultiviert. Für die Messung des Thymidineinbaus wurden jeweils 100 µl Zellsuspension pro Kultur in die Wells von 96-Lochplatten transferiert und für weitere 4 h mit 0,2 µCi H-3-Thymidin inkubiert und danach geerntet. Die Überstände der Kulturen in den 24-Lochplatten wurden nach sieben Tagen geerntet. Im RIA wurden die IgE-Konzentrationen bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen eingezeichnet.

gern. Bei den verwendeten Propranolol-Konzentrationen ließ sich lediglich eine Inhibition der PWM-induzierten IgM-Produktion beobachten.

Zusammenfassend bedeutet das Ergebnis, daß der positive, synergistische Effekt auf die IgG-Produktion und den Thymidineinbau durch die Kombination im Einklang mit der möglichen "Blockierung" von Suppressorzellen steht. Ein verstärkender Einfluß auf die IgE-Produktion ist jedoch durch die Inhibition der Suppressorzellen in den durchgeführten Ansätzen nicht nachzuweisen.

3.3.2. Einfluß von PMA auf die Ig-Produktion

Phorbol Myristat Acetat (PMA) hat einigen Berichten zufolge (Ralph, 1982; Bartoglio, 1983; Aman, 1984) stimulierende Eigenschaften auf die Ig-Produktion von kultivierten PBL. Unbekannt war jedoch der Einfluß von PMA auf die IgE-Produktion. Es wurde deshalb die Aktivität von PMA (4-, 20-, 100 ng/ml) auf die IgM-, IgG- und IgE-Produktion miteinander verglichen. Als zusätzliche Stimulation wurden verschiedene PWM-Konzentrationen (0,16-, 0,8-, 4 µg/ml) eingesetzt. Die produzierten Ig-Mengen wurden nach sieben Tagen in den Kulturüberständen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Abb. 20 dargestellt.

Es ist zu beobachten, daß PMA alleine (in der Abwesenheit von PWM) keinen Einfluß auf die IgM- und IgG-Produktion hat. Ein stimulierender Effekt des PMA (bei 4 ng/ml) deutet sich zwar bei der IgE-Produktion an, ist aber wegen der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Bei zwei Wiederholungen dieses Experimentes ließ sich dieser Effekt nicht bestätigen.

In der Anwesenheit von PWM zeigt PMA (4 - 20 ng/ml) einen stimulierenden, bzw. synergistischen Effekt auf die Aktivierung der IgM- und IgG-Produktion. Dieser Einfluß wird besonders bei der IgM-Produktion deutlich. Die Stimulation

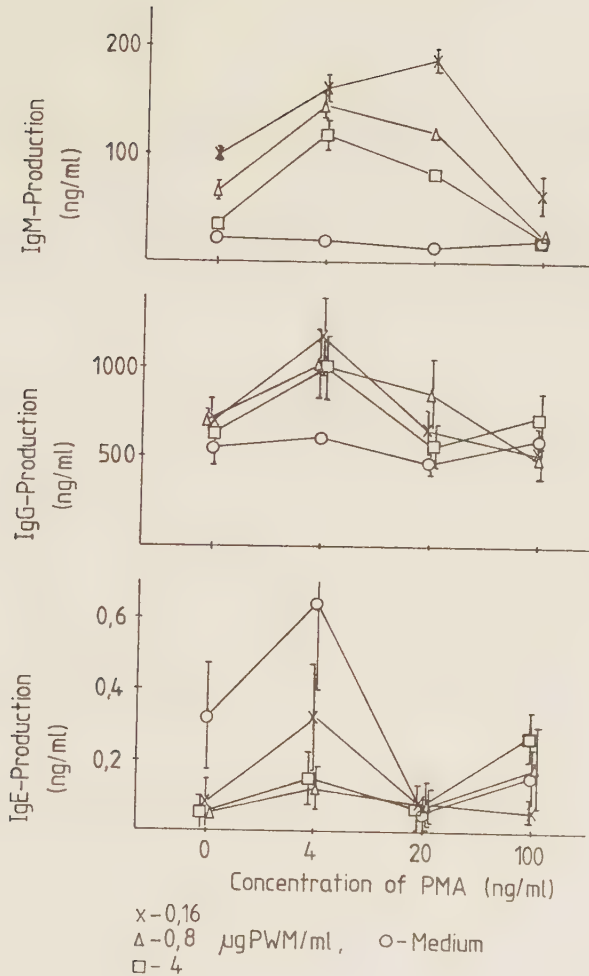


Abb. 20: Einfluß von PMA auf die Immunglobulinproduktion
 1×10^6 /ml wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) bis zur Ernte für sieben Tage mit PMA und PWM in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Die Ig-Konzentrationen der Überstände wurden in Duplikaten in den RIAs gemessen. Die Standardabweichungen wurden durch senkrechte Balken angedeutet.

durch suboptimale PWM-Konzentrationen wird durch die Zugabe von PMA erheblich erhöht.

Zusammenfassend muß der Schluß gezogen werden: PMA hat einen synergistischen Effekt bei der PWM-induzierten Immunglobulinproduktion. Dieser Effekt kann jedoch nicht bei der IgE-Produktion bestätigt werden.

3.4. Die Immunglobulinproduktion von PWM-aktivierten PBL-Kulturen allergischer Spender

Im Rahmen einer klinischen Studie bestand die Gelegenheit, bei Patienten, die an einem allergischen Mehlasthma litten (Bäckerasthma), die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion zu untersuchen. Die hier gesammelten Daten sollten u. a. einen Eindruck über die individuellen Unterschiede in der polyklonalen Immunglobulinproduktion verschaffen. Von besonderem Interesse war dabei, den Zusammenhang zwischen der allergischen Erkrankung und der Produktion von IgE in der Kultur zu überprüfen.

Die sechs Patienten (1 - 6) wurden einer Behandlung mit einem Medikament, Intal, unterzogen, das desensibilisierende Wirkung auf die Reaktion der Mastzellen ausüben sollte. Vor (in den Abbildungen mit a gekennzeichnet), nach der 14tägigen Behandlung (b) und zwölf Monate nach der Behandlung (c) wurden die PBL der Patienten in der Kultur mit verschiedenen PWM-Konzentrationen (s. Abb. 21 - 23) stimuliert. Die Zellen wurden in einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in 24-Lochplatten kultiviert. Überstände dieser Kulturen wurden nach einem, vier, acht und elf Tagen geerntet. IgM-, IgG- und IgE-Konzentrationen wurden im RIA bestimmt. Für den achten Tag wurde als Maß für den Einfluß des PWM ein Stimulationsindex errechnet. Der Index gab den Quotienten der Ig-Konzentration aus der stimulierten Kultur und dem entsprechenden Wert der PWM-freien Kultur an. In einigen Fällen, wo PWM eine Suppression der Ig-Produktion bewirkte, konnte dieser Wert auch kleiner als 1 sein.

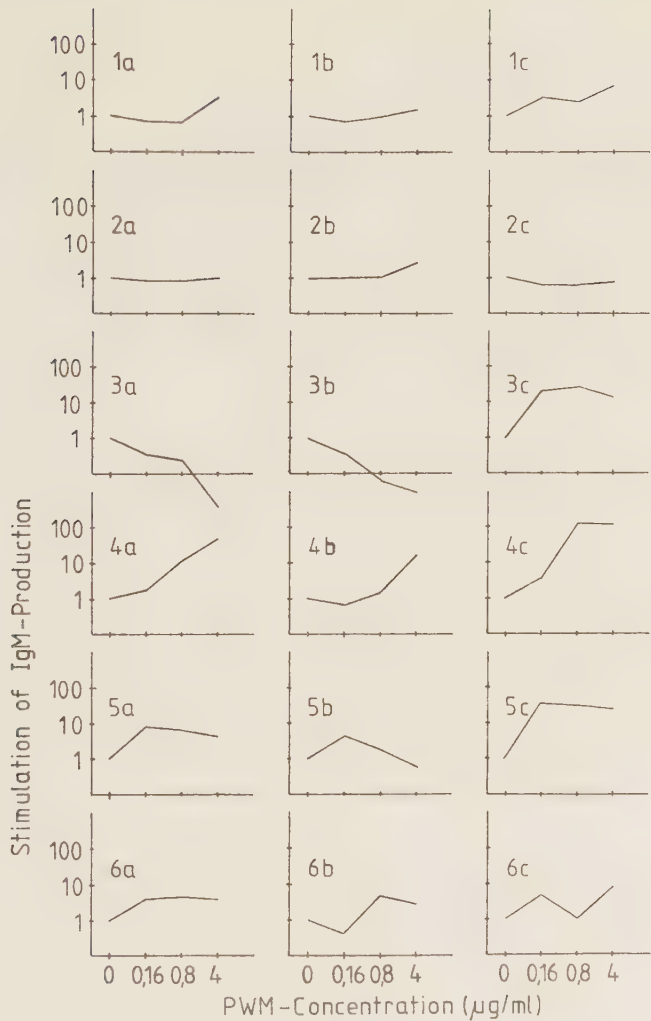


Abb. 21: Individuelle Stimulierungen der IgM-Produktion durch PWM

PBL von sechs verschiedenen Bäckerasthmatikern (Nr. 1 - 6) wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (a, b, c, s. Text) isoliert. Die PBL ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) für acht Tage kultiviert. Die IgM-Konzentrationen wurden wie beschrieben in den geernteten Überständen gemessen. Dargestellt ist der Stimulationsindex in der Abhängigkeit von der eingesetzten PWM-Konzentration. Der Stimulationsindex ist der Quotient aus der PWM-stimulierten Produktion und der Medium-induzierten spontanen Produktion. In dieser Abbildung ist für den Stimulationsindex ein logarithmischer Maßstab gewählt worden.

Die Ergebnisse der PWM-Aktivierungen sind in den Abb. 21, 22 und 23 dargestellt. Wegen der Übersichtlichkeit wurde der Standardfehler nicht eingezeichnet. In der Abb. 21 konnten die IgM-Stimulationen nur logarithmisch dargestellt werden, da sich große individuelle Unterschiede ergaben. In den Abbildungen wird das unterschiedliche Reaktionsmuster der sechs Patienten deutlich.

3.4.1. PWM-induzierte IgM-Produktion (s. Abb. 21)

Nicht in allen Fällen war eine positive Stimulation durch PWM möglich. Patient Nr. 2 zeigte zu den Abnahmedaten a und c keinen Stimulationsindex, der über 1 liegt. Nur zum Zeitpunkt b war eine schwache Stimulation möglich. Ähnlich schwach reagierte der Patient Nr. 1 zum Zeitpunkt b. Der Patient Nr. 3 reagierte bei a und b mit einer starken Suppression auf die Anwesenheit von PWM. Zum Zeitpunkt c war diese Suppression allerdings aufgehoben. Bei den anderen Patienten schien die Höhe der Reaktion, zumindest größenordnungsmäßig, konstant zu bleiben.

3.4.2. PWM-induzierte IgG-Produktion (s. Abb. 22)

Auch hier wird deutlich, daß nicht in allen Fällen eine positive Stimulation möglich war. Patienten Nr. 1 und Nr. 2 reagierten durchweg schwach auf den PWM-Stimulus. Vereinzelt war die Reaktion der anderen Patienten ebenfalls recht schwach. (Im Gegensatz zur Abb. 21, bei der IgM-Produktion, ist kein logarithmischer, sondern ein linearer Maßstab für die Stimulation gewählt worden.) Im Fall Nr. 3 b, 4 b, 6 a und 6 c war keine positive Stimulation zu beobachten. Eine starke Suppression durch PWM, wie bei der IgM-Produktion in den Fällen Nr. 3 a und 3 b, war bei der IgG-Produktion nicht nachzuweisen. Die Stimulation der IgG-Produktion war im Gegensatz zur IgM-Produktion nicht so stark und erreichte im Fall Nr. 5 c einen maximalen Stimulationsindex von 10.

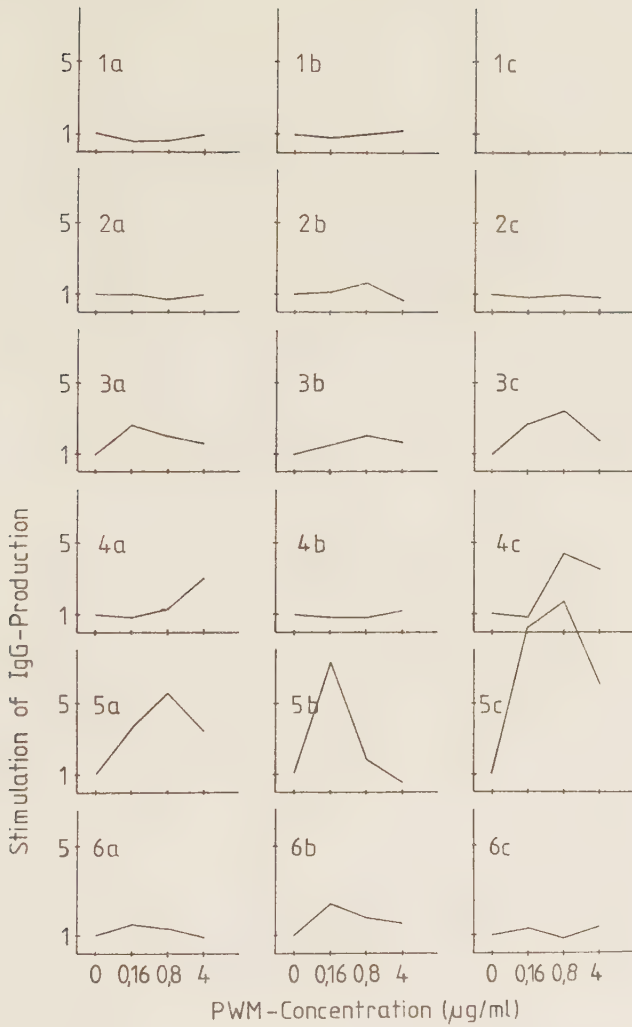


Abb. 22: Individuelle Stimulierungen der IgG-Produktion durch PWM

Legende s. Abb. 21. In dieser Abbildung ist der Stimulationsindex der IgG-Produktion in einem linearen Maßstab dargestellt.

Auffällig war beim Vergleich der Stimulationen der beiden Isotypen IgM und IgG, daß die Reaktionsmuster der einzelnen Kulturansätze nicht gleich waren. So zeigte die IgM-Produktion im Fall 4 b eine Stimulierbarkeit von etwa 10, in der gleichen Kultur fehlt hingegen die Stimulierbarkeit der IgG-Produktion. Eine leichte Stimulation der IgG-Produktion im Fall 3 a und 3 b geht mit der gleichzeitigen starken Suppression der IgM-Produktion durch PWM einher. Es bleibt also festzuhalten, daß die Stimulierbarkeit der Immunglobulinproduktion durch PWM sowohl spenderspezifischen als auch isotypenspezifischen Einflüssen unterliegt.

3.4.3. IgE-Produktion (s. Abb. 23 und 24)

Nur in einer von 18 untersuchten Kulturen war eine signifikante Stimulation der IgE-Produktion durch PWM möglich. Die Kultur 5 b erreichte bei 4 µg/ml PWM einen Stimulationsindex, der deutlich über 2 lag (Abb. 23). In allen anderen Fällen war eine Erhöhung der IgE-Produktion durch PWM nicht signifikant. In einigen Fällen deuteten sich supprimierende Eigenschaften des PWM an (1 c, 2 c, 4 b, 5 c). Diese Effekte waren jedoch bis auf den Fall 1 c nicht signifikant.

Zur Verdeutlichung der IgE-Produktion wurde in der Abb. 24 die spontane IgE-Freisetzung (in der Abwesenheit von PWM) als Zeitkinetik dargestellt. Die Steilheit dieser Kurven gibt die Produktionsrate für IgE wieder. Fast in allen Fällen war ein kontinuierlicher Anstieg zu beobachten, der individualspezifisch sein konnte. Bemerkenswert bei dieser Allergikerstudie war jedoch, daß die in der Kultur produzierten IgE-Mengen überhaupt meßbar, also größer als 200 pg/ml waren. Bei zahlreichen (über 50) Kulturen "normaler" Spender war in rund 80 % der Fälle kein IgE im Kulturüberstand nachweisbar. Nur Spender mit einer allergischen Anamnese produzierten in der Kultur ausreichende IgE-Mengen.

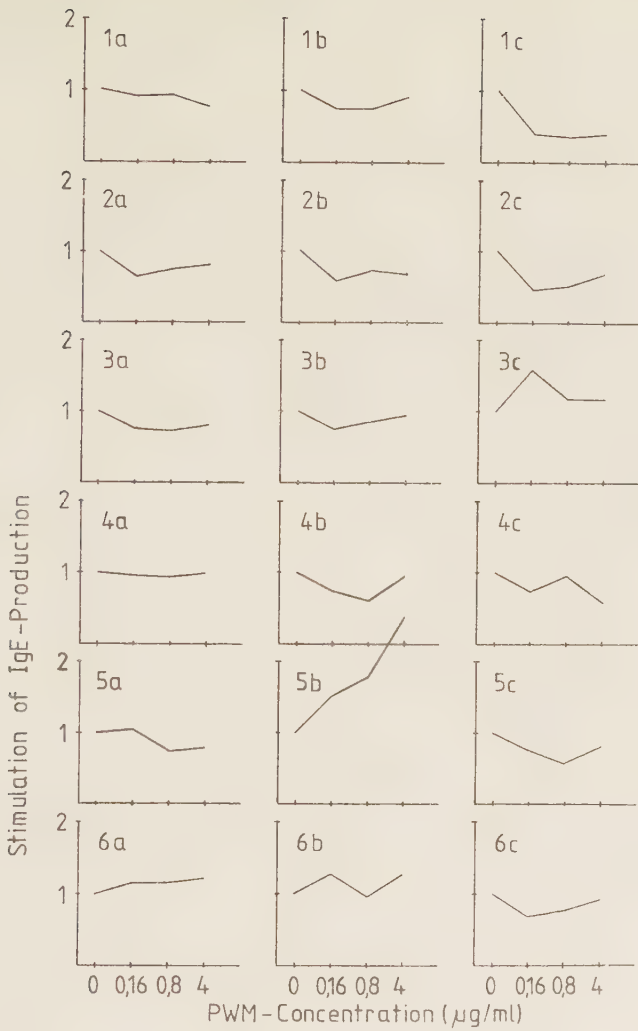


Abb. 23: Individuelle Stimulierungen der IgE-Produktion
Legende s. Abb. 21. Die Stimulation der IgE-Produktion
wurde in einem linearen Maßstab dargestellt.

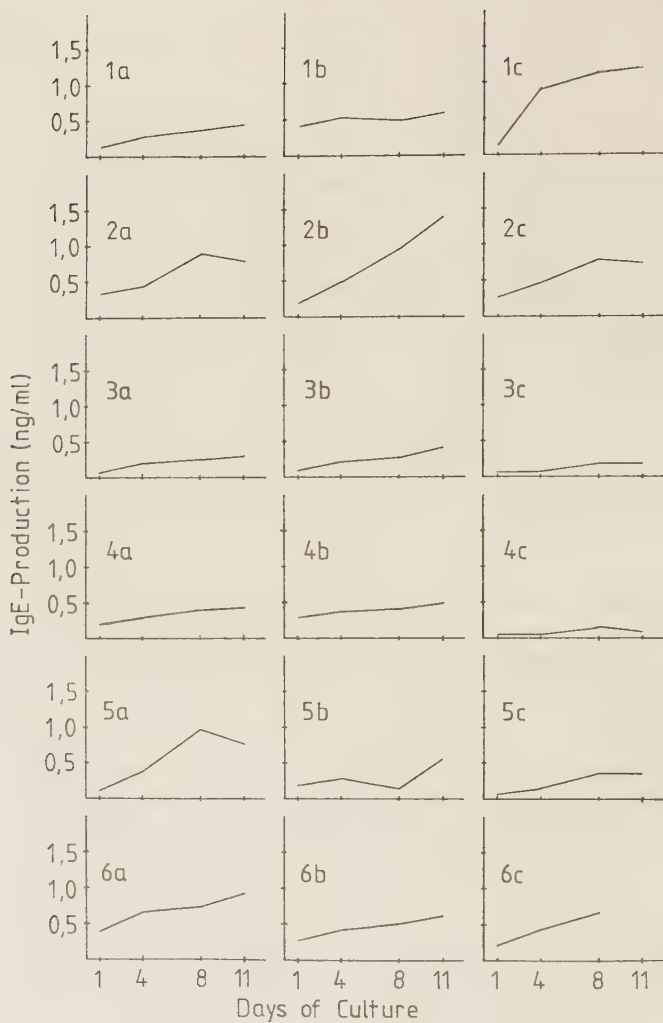


Abb. 24: Spontane IgE-Produktion

Legende s. Abb. 21. Die Überstände wurden nach einem, vier, acht und elf Tagen geerntet. Dargestellt sind die IgE-Konzentrationen aus den PWM-freien Ansätzen in der Abhängigkeit von dem Erntetag.

3.4.4. Spontane Ig-Produktion

In der oben erwähnten Untersuchung der Bäckerasthmatiker wurden die spontanen IgM-, IgG- und IgE-Produktionen analysiert. Die Meßwerte für den achten Kulturtag sind in der Tab. 5 dargestellt. Sehr deutlich wird die große Varianz der individuellen Spontanproduktionen. Die Breite der Meßwerte ist am größten bei der IgM- und IgG-Produktion. Für IgM reicht sie von 12 - 2587 ng/ml, IgG variiert von 93 - 1244 ng/ml. Die IgE-Produktion ist dagegen weniger variabel bei diesen Spendern, sie reicht von 0,141 - 1,123 ng/ml. Eine Normalverteilung scheint bei IgM nicht vorzuliegen. Die Kulturen 3 a und 3 b fallen mit ihren hohen Produktionen aus dem Rahmen. Diese beiden Kulturen waren in der Anwesenheit von PWM nicht stimulierbar (s. Abb. 21), im Gegenteil, es trat eine starke Suppression der hohen Spontanproduktion durch PWM auf. Wahrscheinlich resultierte hier eine in-vivo erfolgte Stimulation der IgM-Produktion in den hohen Meßwerten. Auch bei IgG fallen einige Kulturen durch hohe Spontanproduktionen auf. Die Kulturen 3 a, 3 b und 6 a produzieren mehr als 1000 ng IgG/ml. In diesen Fällen ist aber keine Suppression durch PWM zu bemerken (s. Abb. 22). Allerdings ist die PWM-Stimulation recht gering. Eine Anamnese dieser Fälle könnte versuchen, die Ursache für die aus dem Rahmen fallenden Werte zu finden. Möglicherweise lag eine akute Infektion vor, die die Anzahl der sezernierenden Plasmazellen im peripheren Blut drastisch erhöhte. Ein pharmakologischer Einfluß kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Das mengenmäßige Verhältnis der gemessenen Isotypen in den Kulturen wurde in den drei rechten Spalten der Tab. 5 berechnet. Auch hier scheint eine große Variabilität vorzuliegen. Man kann allenfalls Aussagen über die Größenordnungen zulassen. Beim Verhältnis IgG zu IgM war bis auf drei Ausnahmen (3 a, 5 a und 5 b) die IgG-Produktion größer als die IgM-Produktion. Die IgG-Konzentration in den Kulturen

Tab. 5: Spontane Ig-Produktion von PBL-Kulturen und
Verhältnisse der Immunglobulinklassen

Spender	Konzentrationen			IgG:IgM	Verhältnisse	
	IgM	IgG (ng/ml)	IgE		IgE:IgM	IgE:IgG
1 a	32	206	0,365	6,44	0,0114	0,0018
b	154	316	0,452	2,05	0,0029	0,0014
c	81	195	1,123	2,41	0,0139	0,0058
2 a	14	109	0,854	7,79	0,0610	0,0078
b	26	241	0,938	9,27	0,0361	0,0039
c	61	242	0,775	3,97	0,0127	0,0032
3 a	2597	1027	0,258	0,40	0,0001	0,0003
b	629	1244	0,255	1,98	0,0004	0,0002
c	30	125	0,185	4,17	0,0062	0,0015
4 a	11	250	0,380	22,73	0,0345	0,0015
b	21	357	0,400	17,00	0,0190	0,0011
c	18	317	0,141	17,61	0,0078	0,0004
5 a	282	185	0,952	0,66	0,0034	0,0051
b	308	93	0,227	0,30	0,0007	0,0024
c	56	680	0,361	12,14	0,0064	0,0005
6 a	387	1123	0,736	2,90	0,0019	0,0007
b	343	570	0,497	1,66	0,0014	0,0009
c	12	167	0,668	13,92	0,0057	0,0040
Mittelwert	281	414	0,532	7,08	0,0153	0,0024
Standard- abweichung	602	364	0,301	6,87	0,0190	0,0021
Varianz %	214	88	57	97	124	88

PBL (1×10^6 /ml) wurden acht Tage kultiviert. In den Überständen wurde die spontane Ig-Produktion gemessen. Die Zellen von sechs verschiedenen Spendern (Bäckerasthmatiker; 1 - 6) wurden bei drei verschiedenen Abnahmedaten (s. 3.4.) präpariert und kultiviert.

war bis zu 22-mal höher. Bei einem Spender (Nr. 4) war dieses Verhältnis bei allen drei Abnahmen einigermaßen konstant, es lag zwischen 17 und 23. Die anderen Spender verhielten sich in dieser Hinsicht sehr variabel. Das Mittel aller Verhältnisse von IgG zu IgM lag bei 7,08. Die rechnerische Standardabweichung war dabei 6,87. Eine Normalverteilung der Verhältnisse lag nicht vor. Auch die Verhältnisse IgE zu IgM sowie IgE zu IgG waren nicht konstant. Die Varianzen bei der Mittelwertbildung lagen bei 124 % bzw. 88 %. Diese hohen Streuungen waren weniger auf das IgE als auf die beiden anderen Isotypen zurückzuführen.

Die Gesetzmäßigkeiten bei der spontanen Ig-Produktion scheinen also von sehr vielen Variablen abhängig zu sein, die außerordentlich schwierig zu beurteilen sind. Die Effekte können mit der in vivo Situation erklärt werden, allerdings gibt es hier viele Möglichkeiten der Erklärung, die in der vorgelegten Untersuchung nicht abgeklärt werden konnten. Dazu gehören die Aktivität der Plasmazellen, der Suppressorzellen, der Helferzellen und Makrophagen/Monozyten, deren Zusammenspiel die Höhe der spontanen Produktion beeinflusst. Das Ergebnis macht deutlich, wie variabel die spontane Immunglobulinproduktion sein kann.

3.5. Aktivität der Überstände von ConA-Sepharose aktivierten PBL (CASS)

In mehreren Experimenten wurde die kommerziell erhältliche ConA-Sepharose als Stimulanz eingesetzt, um Lymphokin-haltige Überstände zu produzieren, die frei von löslichem Lektin (z. B. ConA) waren. PBL wurden in einer Dichte von $3 \times 10^6/\text{ml}$ mit 5 % (Gelvolumen) ConA-Sepharose versetzt und für 24 h in Gewebekulturflaschen inkubiert. Die Überstände dieser Kulturen wurden zunächst in der Konzentration von 16,7 % in der PWM-stimulierten Ig-Produktion von PBL-Kulturen ausgetestet.

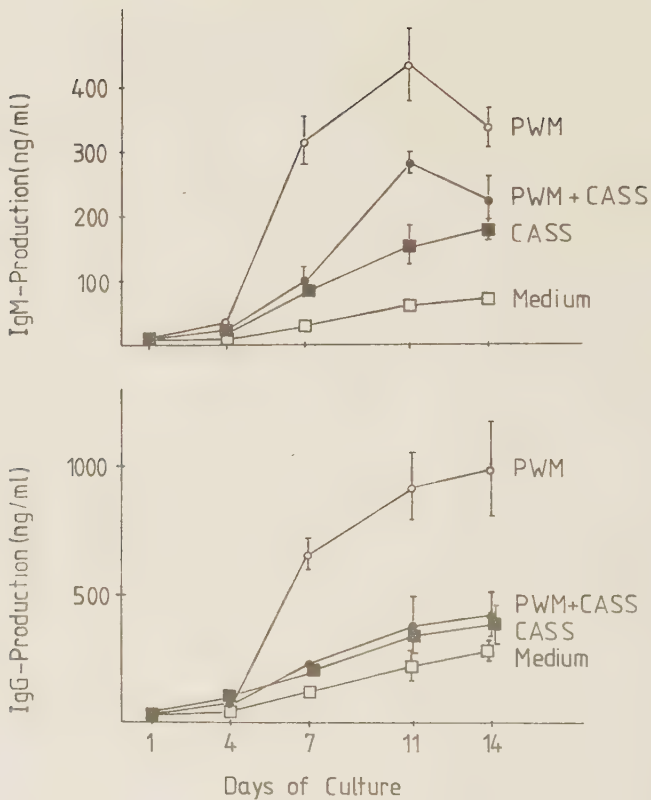


Abb. 25: Einfluß von CASS auf die Ig-Produktion, Zeitkinetik

PBL (1×10^6 /ml) wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) für unterschiedliche Zeiten (s. X-Achse) kultiviert. Als Zusätze waren CASS (16,7 % v/v) und PWM (1 µg/ml) bzw. Mediumkontrollen anwesend. Die Ig-Konzentrationen wurden in den geernteten Überständen wie beschrieben in den entsprechenden RIAs gemessen. Die Standardabweichung ist als senkrechter Balken angedeutet.

3.5.1. Zeitkinetik

Die Aufnahme einer Zeitkinetik der Ig-Produktion unter dem kombinierten Einfluß von PWM und CASS ist in der Abb. 25 dargestellt. Das Ergebnis des Experiments macht den inhibierenden Einfluß von CASS auf die PWM-stimulierte Ig-Produktion deutlich. Der steile Produktionsanstieg der Ig-Produktion nach der Anlaufphase wird durch die Anwesenheit von CASS deutlich flacher, liegt jedoch noch immer über der spontanen Produktion der Mediumkontrolle. Umgekehrt wird jedoch die Ig-Produktion durch CASS bei der Abwesenheit von PWM stimuliert. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei der IgM-Produktion zu bemerken. Aus dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß die Ig-Produktion, die durch CASS alleine induziert wird, verglichen mit der Mediumkontrolle relativ steil ansteigt. Das bedeutet, daß anscheinend neue Plasmazellen durch CASS generiert wurden und daß in der Kultur ein dynamischer Prozeß induziert wurde.

Die Ergebnisse des Versuches demonstrieren die verschiedenen Aktivitäten von CASS. Die erste Aktivität inhibiert eine PWM-induzierte Ig-Produktion. Die zweite Aktivität stimuliert hingegen die Ig-Produktion, allerdings nur in der Abwesenheit von PWM.

3.5.2. Dosisabhängigkeit der CASS-Aktivität

Bei anderen Experimenten wurde die Dosisabhängigkeit der CASS-Aktivitäten untersucht. PBL (1×10^6 /ml) wurden mit und ohne PWM für sieben Tage kultiviert. In der Abb. 26 wurden die Ergebnisse der Kultur bei der optimalen PWM-Konzentration (0,8 µg/ml) dargestellt. Die Zugabe einer Verdünnungsreihe von CASS (16,7 %, 3,3 % und 0,67 %) zeigte eine Abhängigkeit der Suppression von der CASS-Konzentration. Bemerkenswert war, daß die Suppression der IgG-Produktion schon bei geringeren Konzentrationen des Überstandes einsetzte als bei der IgM-Konzentration. Auch der stimulierende Einfluß von CASS in

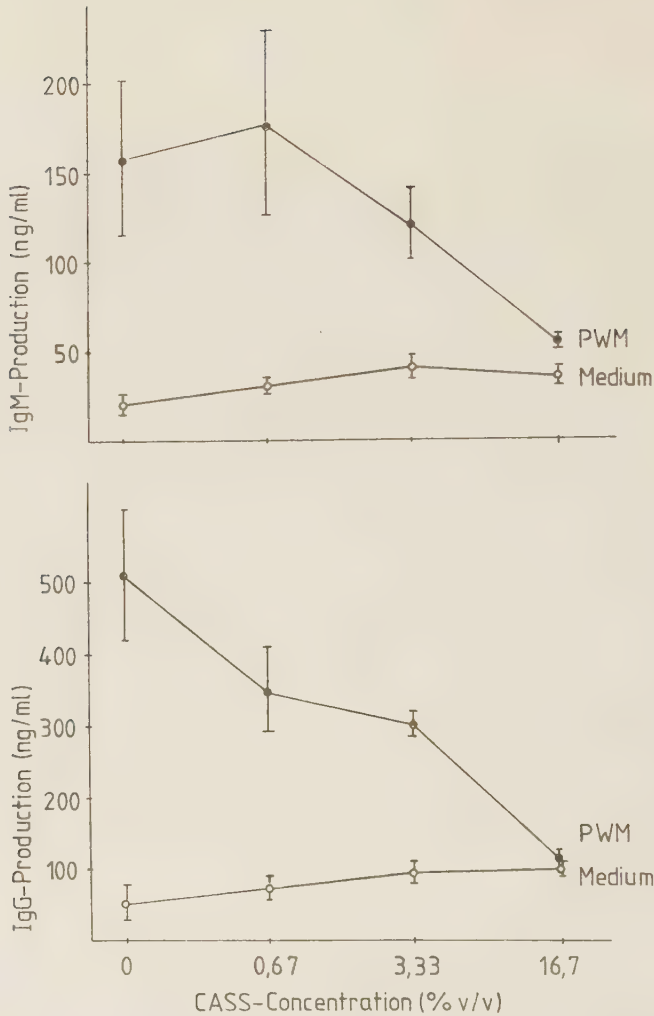


Abb. 26: Die Dosisabhängigkeit der CASS-Aktivität

1×10^6 PBL/ml wurden mit und ohne PWM ($0,8 \mu\text{g/ml}$) in $1,5 \text{ ml}$ Kulturen (Triplikate) für sieben Tage kultiviert. CASS war in einer Konzentration von $16,7 \%$, $3,3 \%$ und $0,67 \%$ (v/v) als Zusatz anwesend. Die Ig-Konzentrationen wurden in den Überständen wie beschrieben in den entsprechenden RIAs gemessen. Die senkrechten Balken geben die Standardabweichungen an.

der Abwesenheit von PWM verhielt sich konzentrationsabhängig. Der Effekt war hier jedoch nicht so deutlich zu zeigen wie bei der Zeitkinetik.

3.5.3. PWM-Kinetik

In der Abb. 27 ist ein weiteres Experiment dargestellt, das die Inhibition der Ig-Produktion zeigt, die durch eine PWM-Verdünnungsreihe induziert wurde. CASS wurde wieder in einer Konzentration von 16,7 % eingesetzt. Die Ig-Konzentrationen wurden in den Überständen von Sieben-Tage-Kulturen bestimmt. Das Ergebnis läßt erkennen, die Stimulation der PWM-induzierten IgM- und IgG-Produktion wurde durch die Anwesenheit von CASS stark inhibiert. Bei der hier meßbaren IgE-Produktion, die sich, wie bereits mehrfach gezeigt, durch PWM nicht stimulieren ließ, wurde durch CASS weder positiv noch negativ beeinflußt. In mehr als 15 anderen Experimenten, bei denen die IgE-Produktion gemessen wurde, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Einfluß des CASS auf die IgE-Produktion.

3.5.4. Spenderspezifische Einflüsse auf die Inhibition

Der supprimierende Einfluß von CASS auf die PWM-induzierte IgM- und IgG-Produktion konnte in mehr als 20 Experimenten nachgewiesen werden. In der Tab. 6 ist ein Teil dieser Experimente dargestellt. Die Suppressionseffekte von vier CASS unterschiedlicher Spender (I - IV) auf die Testkulturen von fünf anderen Spendern (A, B, C, D, E) wurden gemessen. Berechnet wurde die prozentuale Suppression bei der jeweils optimalen PWM-Stimulation. Eingesetzt wurden 0,16-, 0,8 und 4 µg/ml PWM. Die Testkulturen (1×10^6 PBL/ml) wurden für sieben Tage kultiviert. Die Suppression wurde bezogen auf die Differenz zwischen den Ig-Konzentrationen bei der optimalen Stimulation und der Mediumkontrolle (spontane Produktion)

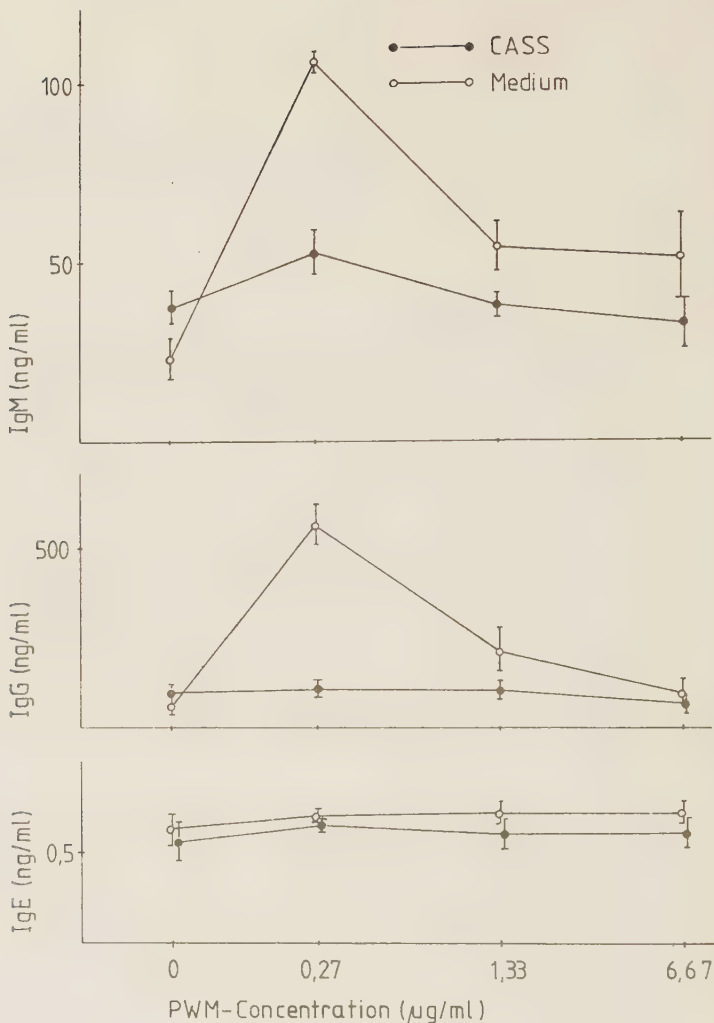


Abb. 27: Die CASS-Wirkung auf die Immunglobulinproduktion in Abhängigkeit von der PWM-Konzentration

1×10^6 PBL/ml (von einem allergischen Spender) wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) zusammen mit verschiedenen PWM-Konzentrationen (s. X-Achse) und 16,7 % CASS bzw. Medium kultiviert. Die Überstände wurden nach sieben Tagen geerntet und in den entsprechenden RIAs (Duplikate) gemessen. Die Standardabweichungen sind als senkrechte Balken eingezeichnet.

Tab. 6: Suppression der PWM-induzierten Ig-Produktion

CASS	Test-PBL-Spender	IgG	IgM
I	A	28 %	0 %
	B	0 % *	55 %
	C	57 %	63 %
	D	82 %	87 %
II	A	54 %	21 %
	B	0 % *	50 %
	C	85 %	68 %
	D	82 %	87 %
III	D	76 %	31 %
	E	94 %	91 %
IV	D	70 %	82 %
	E	92 %	95 %

* keine PWM-Stimulation möglich

Als Ergebnis dieser Versuchsreihe war festzuhalten, daß die vier CASS bei fast allen Testkulturen die PWM-induzierte Ig-Produktion supprimieren konnten. Lediglich bei der Kombination CASS I in der Testkultur A ließ sich die IgM-Produktion nicht supprimieren. Der gleiche CASS zeigte bei anderen Testkulturen (B, C, D) jedoch supprimierende Wirkung. Auf der anderen Seite ließ sich die IgM-Produktion der Testkultur A durch einen anderen Überstand (II) um 21 % supprimieren. Dieser Suppressionswert war allerdings sehr niedrig im Vergleich zu den anderen Werte, so daß der niedrige Suppressionseffekt möglicherweise mit der individuellen Beschaffenheit der Testkultur zu erklären ist.

In einem anderen Fall (Testkultur B) war keine Stimulation der IgG-Produktion möglich. PWM hatte in allen verwendeten Konzentrationen schon ohne die Anwesenheit von CASS einen stark supprimierenden Effekt. Die Überstände I und II hatten in der Kombination mit PWM keinen Einfluß. Bei der fehlenden Stimulation konnte natürlich keine Suppression, die auf CASS zurückzuführen war, gemessen werden. Auffällig war in diesem Fall das unterschiedliche Verhalten der IgG- und IgM-Produktion. Während IgG sich wie beschrieben durch PWM alleine supprimieren ließ, zeigte die Stimulation der IgM-Produktion eine normale Reaktion. Auch die Wirkung von CASS in der Suppression der Stimulierung verhielt sich wie erwartet.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe legen den Schluß nahe, daß die PWM-stimulierte Testkultur individuell verschieden auf die Zugabe von CASS mit der Induktion eines Suppressionsmechanismus reagieren kann.

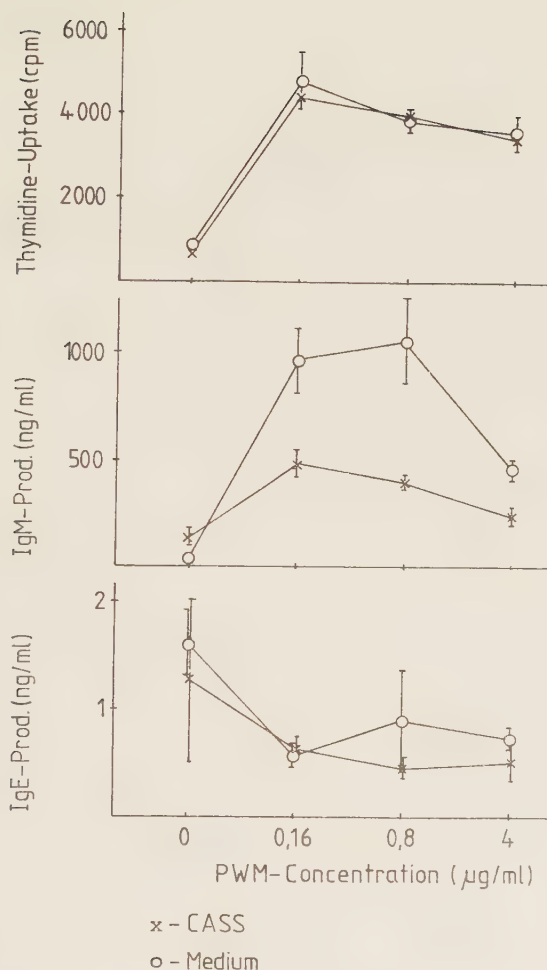


Abb. 28: Einfluß von CASS auf die Ig-Produktion und den Thymidineinbau

1×10^6 PBL/ml wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) mit einer Verdünnungsreihe von PWM kultiviert. Am dritten Tag wurden 100 µl der Kulturen suspendiert und in 96-Lochplatten transferiert und für weitere 4 h mit 0,2 µCi H-3-Thymidin bis zur Ernte inkubiert. Die Überstände der restlichen 1,5 ml Kultur wurden am siebten Tag geerntet und in den entsprechenden RIAs gemessen (Duplikate). Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Meßwerten mit der Standardabweichung als senkrechter Balken.

3.5.5. Einfluß von CASS auf den Thymidineinbau transformierter PBL-Kulturen

Die Transformation von PBL-Kulturen nach einem Mitogen-Stimulus, wie etwa durch die Lektine PWM oder ConA, führt unter anderem zu einer Erhöhung der DNA-Synthese. Dieser Prozeß kann relativ leicht durch den Thymidineinbau verfolgt werden. Da CASS Effekte auf die Ig-Produktion zeigte, entstand die Frage, ob ähnliche Effekte auch mit der Messung des Thymidineinbaus zu verfolgen waren. Der Thymidineinbau wurde in einer Versuchsserie parallel zur PWM-Stimulation gemessen. Dazu wurden am dritten Kulturtag jeweils 100 µl Zellsuspension aus den 1,5 ml Kulturansätzen in 96-Lochplatten transferiert und für 4 h mit 0,2 µCi H-3-Thymidin in 10 µl inkubiert. Die in die Zellen eingebaute Aktivitätsmenge wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben, bestimmt. Die Einbaurate der PWM-stimulierten Lymphozyten wurde mit dem Ergebnis der Ig-Produktion (nach sieben Tagen Kultur) verglichen.

In der Abb. 28 ist der Thymidineinbau, die IgM- und die IgE-Produktion dargestellt. Wie in mehreren Wiederholungen dieses Versuches auch, hat CASS keinen signifikanten Einfluß auf den Thymidineinbau der transformierten Zellen. Der Effekt auf die IgM-Produktion ist dagegen deutlich zu sehen. CASS verursacht eine leichte Erhöhung der Spontanproduktion in der Abwesenheit von PWM und reduziert die PWM-induzierte Produktion. Auch in diesem Experiment ist kein signifikanter Einfluß auf die IgE-Produktion zu registrieren.

Die Wirkung von CASS wurde auch auf den ConA-induzierten Thymidineinbau untersucht (s. Abb. 29). Vier bereits ausgetestete und aktive CASS-Überstände zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Einbaurate der transformierten Zellen am dritten Tag. Auch bei PWM-transformierten Zellen zeigte sich kein signifikanter Effekt. Hier gab es allerdings eine gewisse Tendenz zur Erhöhung des Thymidineinbaus, die jedoch statistisch nicht abzusichern war.

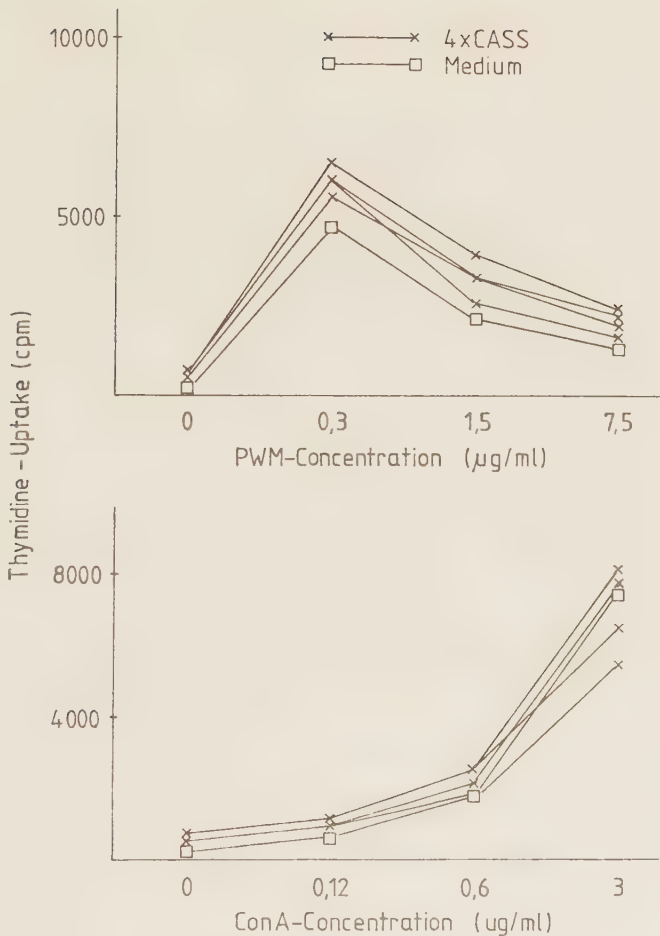


Abb. 29: Einfluß von CASS auf den PWM- und ConA-induzierten Thymidineinbau

PBL (1×10^6 /ml) wurden in 150 µl Kulturen (Triplikate in 96-Lochplatten) mit den angegebenen Konzentrationen (X-Achsen) von PWM und ConA zusammen mit vier verschiedenen CASS-Präparationen in einer Konzentration von 16,7 % (v/v) kultiviert. Am dritten Tag wurde den Kulturen 0,2 µCi H-3-Thymin für weitere 4 h angeboten. Dargestellt ist die Radioaktivität des zellulär gebundenen H-3-Thymidins in der Abhängigkeit von der Lektinkonzentration. Die Mittelwerte sind wegen der Übersichtlichkeit ohne Standardabweichungen eingezeichnet. Die Standardabweichungen waren in der Größenordnung von 10 % des Mittelwertes.

3.5.6. Vergleich der Wirkung von CASS und ConA auf die PWM-induzierte Ig-Produktion

Für die Induktion der CASS-Überstände wurde ConA-Sepharose benutzt, um Lymphokin-haltige Überstände zu erhalten, die frei von löslichen Lektinen waren. In ungetrennten PBL-Kulturen hätten die löslichen Lektine (wie ConA) alleine eine Suppression induzieren können. Es war deshalb wichtig zu wissen, ob der Suppressionseffekt von CASS eventuell darauf zurückzuführen war, daß sich während der Inkubation für die Produktion von CASS ConA von der Sepharose löste und eine neu generierte Aktivität der PBL vortäuschte. Zu diesem Zweck wurde ein bekannter Inhibitor von ConA, alpha-D-Methyl-Mannosepyranosid (MM), eingesetzt. Die Wirkung von MM wurde durch lösliches ConA überprüft.

Es wurde in einem Ansatz also die supprimierende Wirkung von löslichem ConA auf die PWM-induzierte Ig-Produktion gemessen, und parallel dazu konnte die ConA-blockierende Wirkung von MM demonstriert werden. In der Abb. 30 zeigt das Blockdiagramm das Ergebnis dieses Ansatzes. Die ersten beiden Balken machen die positive Stimulation der Ig-Produktion durch PWM deutlich. Der nächste Balken läßt die supprimierende Wirkung von löslichem ConA auf die PWM-induzierte Produktion erkennen. Sie wird auf die spontane Produktion reduziert (100 % Suppression). Die gleichzeitige Anwesenheit von MM in diesem Ansatz hebt diese Suppression nahezu wieder auf (vgl. 3. und 4. Balken). Die Wirkung von MM auf ConA wird dadurch belegt. Die Balken 5 und 6 zeigen das Ergebnis von einem Kulturansatz, in dem CASS für die Suppression der Ig-Produktion eingesetzt wurde. Die Suppression durch CASS beträgt bei IgG 100 % und etwa 60 % bei der IgM-produktion. Das Ausmaß dieser Suppression wird jedoch durch die Anwesenheit von MM nicht aufgehoben. Dieses Ergebnis belegt also, daß die supprimierende Wirkung nicht auf freigewordenes ConA zurückgeführt werden kann.

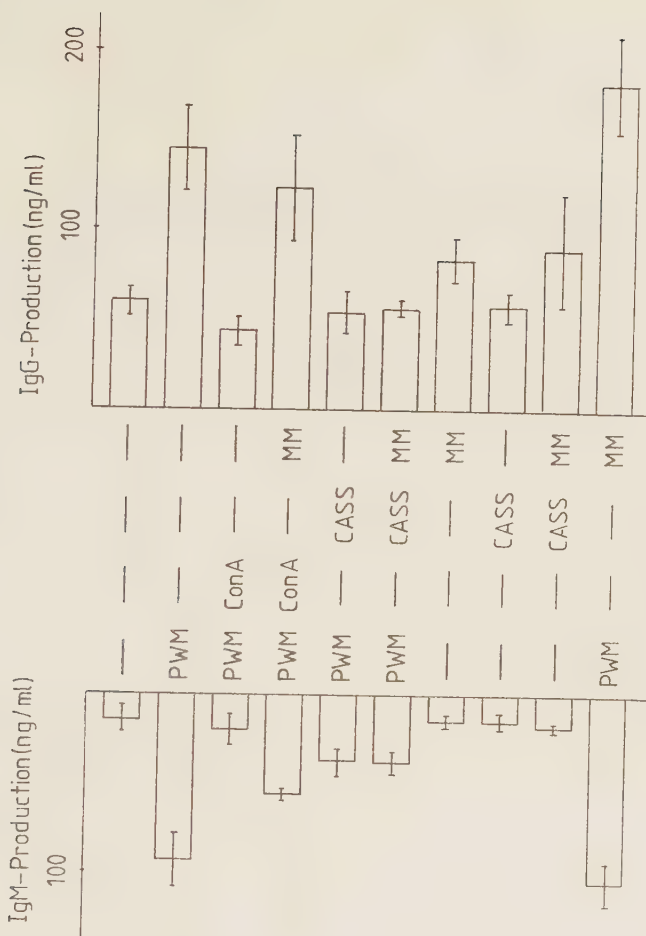


Abb. 30: Die Wirkung von MM bei der CASS-induzierten Suppression

1×10^6 PBL/ml wurden in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) mit den angegebenen Zusätzen in den angegebenen Kombinationen kultiviert. Die jeweiligen Konzentrationen in der Kultur betragen: PWM - 0,8 μ g/ml; ConA - 1 μ g/ml; MM - 30 mmol; CASS - 16,7 % (v/v). Die Überstände wurden nach sieben Tagen geerntet und in den entsprechenden RIAs gemessen (Duplikate). Die Mittelwerte sind mit den Standardabweichungen eingezeichnet.

3.5.7. Wirkung von CASS auf PWM-voraktivierte PBL

Die bis hierher beschriebenen Versuche mit CASS haben sowohl die supprimierende als auch die stimulierende Wirkung auf die Ig-Produktion demonstriert. Entscheidend für die Wirkung von CASS war dabei die Anwesenheit des PWM. Es blieb jedoch ungeklärt, ob CASS seine supprimierende Wirkung allein durch die Anwesenheit von PWM entwickelte oder ob eine PWM-unabhängige Wirkung auf PWM-stimulierte PBL-Kulturen mit einer hohen Menge von sezernierenden Plasmazellen vorherrschte. CASS wurde deshalb in einer PBL-Kultur eingesetzt, die mit PWM für drei Tage vorstimuliert war. Die stimulierten Zellen wurden nach der Vorinkubation sorgfältig durch Waschen vom PWM befreit. Die Weiterkultur der Zellen geschah mit und ohne PWM. Beide Ansätze wurden mit und ohne CASS kultiviert. Die IgM- und IgG-Produktion wurde über eine Zeitkinetik verfolgt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 31 dargestellt.

Wie schon im Abschnitt 3.2. gezeigt, war die Weiterkultur in PWM-freiem Kulturmedium gegenüber der Weiterkultur mit PWM in der Ig-Produktion überlegen. Diese Kultur schien eine relativ hohe Menge an sezernierenden Plasmazellen aufzuweisen. Die Anwesenheit von CASS reduzierte jedoch nicht die Produktion, sondern stimulierte sie noch erheblich. Im Gegensatz dazu war bei einer Weiterkultur in PWM-haltigem Kulturmedium eine Suppression durch CASS zu beobachten.

Die Wirkung von CASS war also von der Anwesenheit des PWM abhängig. PWM kombiniert mit CASS wirkte supprimierend, ohne PWM zeigte CASS eine stimulierende Wirkung. Die Suppression durch CASS konnte nicht direkt auf die sezernierende PBL-Kultur wirken.

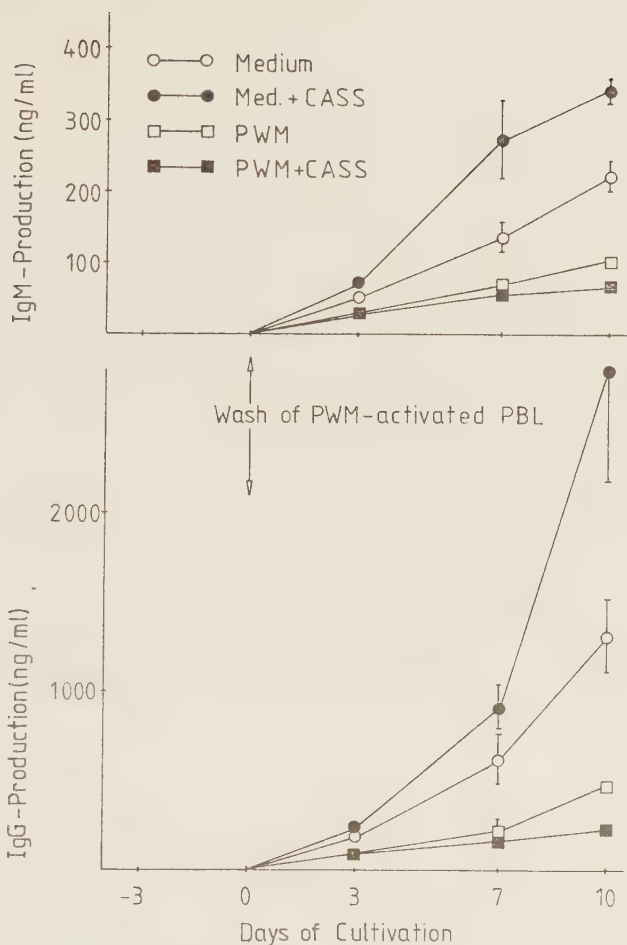


Abb. 31: Wirkung von CASS auf voraktivierte PBL

3×10^6 PBL/ml wurden drei Tage mit PWM ($1 \mu\text{g/ml}$) vorinkubiert, sorgfältig gewaschen und zu 1×10^6 /ml in 1,5 ml Kulturen für unterschiedliche Zeiten (s. X-Achse) mit den angegebenen Zusätzen weiterkultiviert. PWM: $0,3 \mu\text{g/ml}$; CASS: 16,7 % (v/v). Die Überstände der Kulturansätze (Triplikate) wurden in den entsprechenden RIAs in Duplikaten gemessen. Die Standardabweichungen der Mittelwerte sind als senkrechte Balken angedeutet.

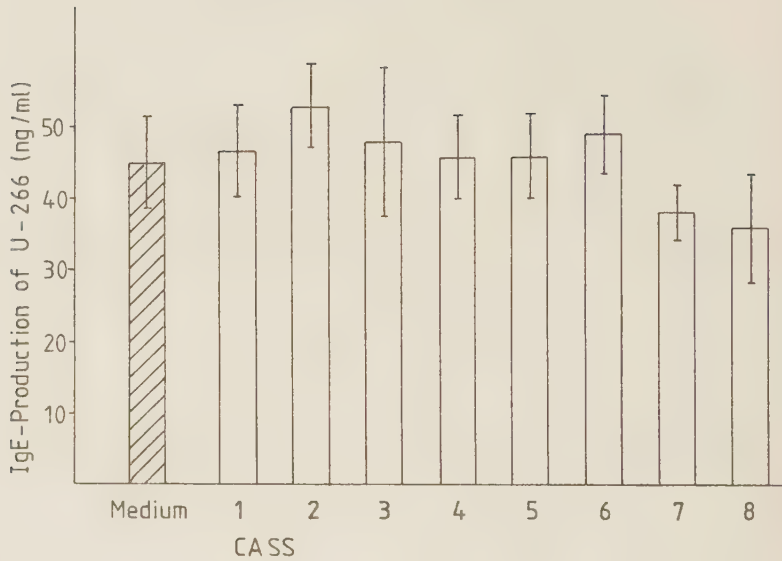


Abb. 32: Wirkung von CASS auf die Ig-Sekretion von Myelomazellen

U-266-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 /ml in 1,5 ml Kulturen (Triplikate in 24-Lochplatten) für drei Tage in der Anwesenheit von 33 % CASS kultiviert. Die geernteten Überstände wurden im IgE-RIA gemessen (Duplikate). Die Mittelwerte sind mit den Standardabweichungen eingezeichnet.

3.5.8. Wirkung der CASS-Überstände auf die IgE-Produktion einer Myeloma Zelllinie "U-266"

Die suppressive Wirkung von CASS sollte an Zellen überprüft werden, die kontinuierlich Immunglobuline synthetisieren und sezernieren können, ohne vorher aktiviert werden zu müssen. Für diese Zwecke stand eine humane Myeloma Zelllinie (U-266, Nilsson, 1971) zur Verfügung, die IgE produzierte. Die U-266-Zellen wurden im Kulturmedium kultiviert und konnten kontinuierlich vermehrt werden. 1×10^5 Zellen/ml und 33 % (v/v) CASS wurden in 1,5 ml Gesamtvolumen für mehrere Tage inkubiert. Die Überstände dieser Kulturen wurden geerntet und im IgE-RIA gemessen. Die Ergebnisse einer drei-Tage-Kultur sind in der Abb. 32 dargestellt. Die Zugabe von acht verschiedenen CASS-Überständen ergab keine Beeinflussung der IgE-Produktion. Auch bei einer längeren Inkubationszeit zeigten sich keine Effekte. Mehrere Wiederholungen dieses Experimentes bestätigten das Ergebnis.

3.5.9. Einfluß der Fixierung von ConA-Sepharose

Bei der Gewinnung von ConA-Sepharose-Überständen (CASS) wurde routinemäßig eine parallele, zellfreie Kontrolle hergestellt. Diese Kontrolle war nötig, da bei einigen älteren Chargen der ConA-Sepharose in derartigen Kontrollüberständen eine mitogene Wirkung auf PBL-Kulturen festzustellen war, die mit Hilfe eines Thymidineinbaus gemessen werden konnte. Da sich bei diesen Chargen das ConA vermutlich bei der Inkubation ablöste, wurden die Chargen wie unter Material und Methoden beschrieben, mit Glutaraldehyd behandelt. Diese Behandlung konnte das ConA zusätzlich an der ConA-Sepharose binden. Die Eigenschaften der ConA-Sepharose hinsichtlich der Induktion von Lymphokinen wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Stellvertretend für die Aktivitäten der ConA-Sepharose ist in der Abb. 33 die mitogene Wirkung der fixierten ConA-Sepharose gezeigt. Die Kultur von PBL mit den

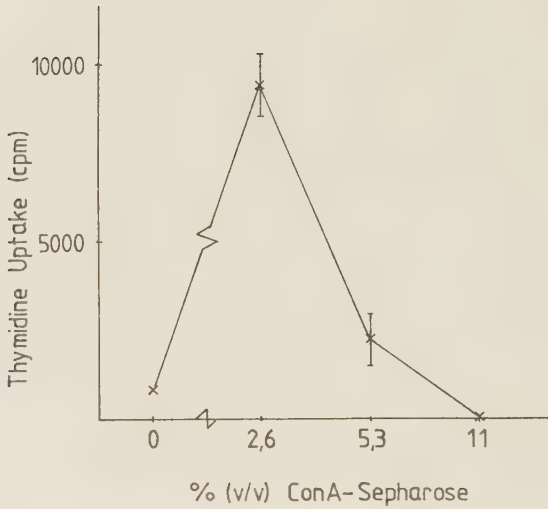


Abb. 33: Mitogene Wirkung von ConA-Sepharose

PBL (1×10^6 /ml) wurden in 150 μ l Kulturen (Triplikate in 96-Lochplatten) für drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der ConA-Sepharose (s. X-Achse) kultiviert. Am dritten Tag wurden die Kulturen für die letzten 4 h mit 0,2 μ Ci H-3-Thymidin inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der zellgebundenen Radioaktivität mit den Standardabweichungen.

gezeigten ConA-Sepharose-Konzentrationen demonstriert einen Thymidineinbau, der vergleichbar mit löslichem ConA bzw. nichtfixierter ConA-Sepharose ist. Die Inkubationsüberstände von fixierter ConA-Sepharose mit Kulturmedium (24 h, 37° C) zeigten auf PBL-Kulturen keinerlei mitogene Wirkung, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Bindung des ConA an die Sepharose durch die Glutaraldehyd-Behandlung stabilisiert wurde, ohne die biologischen Eigenschaften zu verändern.

3.6. Messung der TCGF-Aktivität von CASS

Bei der Transformation von Lymphozytenkulturen setzt in der Regel nach der Aktivierung die sogenannte Lymphokinkaskade ein, die unter anderem den T-Zellwachstumsfaktor TCGF freisetzt. Da bei der Produktion von CASS durch die Inkubation der PBL mit ConA-Sepharose eine Lymphozytenaktivierung stattfindet, bestand die Frage, ob auch hier TCGF freigesetzt wurde. Da ConA-Sepharose genau wie lösliches ConA mitogene Aktivität aufwies (s. Abb. 33, Abschnitt 3.5.9.), war es sehr wahrscheinlich, daß im CASS-Überstand TCGF enthalten war.

Für die Messung wurden aktivierte T-Zellen mit Hilfe von TCGF-haltigem Überstand, Lymphocult (Bonnard et al., 1980), über mehrere Passagen in Kultur gehalten. Es zeigte sich, daß derartige T-Zellkulturen abhängig von 10 - 20 % Lymphocult propagiert werden konnten. Allerdings wurde die Lebensdauer dieser Kulturen mit etwa vier Wochen meist nicht überschritten. Nach diesem Zeitpunkt ließen sich die Zellen auch mit hohen Lymphocult-Konzentrationen nicht weiter vermehren. Nur in einem Fall gelang es, eine TCGF-abhängige T-Zelllinie zu kultivieren, die sich vier Monate lang vermehren ließ. Eine Klonierung dieser Zelllinie wurde versucht, gelang jedoch weder mit dem Verfahren der "limiting dilution", noch mit einem "soft agar cloning". Beide Verfahren wurden jedoch ohne den Einsatz von sogenannten "feeder"-Zellen durchgeführt, so daß hier noch experimentelle Möglichkeiten offen bleiben.

In den Meßkulturen wurden T-Zellblasten eingesetzt, die mindestens 14 Tage in Kultur und deutlich von der Anwesenheit des Lymphocult abhängig waren. Am besten konnte diese Abhängigkeit bei der Propagation der Kulturen beurteilt werden, wenn beim Aufteilen der Zellen Parallelkulturen ohne Lymphocult angelegt wurden. Spätestens nach zwei bis drei Tagen waren die Zellen dieser Kulturen schon im Inversmikroskop mit Phasenkontrast als abgestorben zu erkennen. Durch Isolierung der T-Zellblasten im diskontinuierlichen Dichtegradienten wurden die Zellen von kleinen, dichten Zellen sowie von abgestorbenen Zellen befreit. Dieses Verfahren ergab eine einheitliche Zellpopulation, die morphologisch als Blasten zu erkennen war.

Im Meßansatz hatte sich für den Thymidineinbau ein Inkubationsintervall von der 24. bis zur 48. Stunde der Kultur bewährt. Als Zelldichte war $1 \times 10^5/\text{ml}$ bzw. $1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ Kultur ausreichend. In jedem Meßansatz wurden zur Kontrolle ConA- und PHA-Verdünnungen mitgeführt, da das Lymphocult-Präparat von der Herstellung einen gewissen Anteil an PHA mitbrachte. Nur wenn die Zellen nicht auf diese Mitogene reagierten, konnten die T-Zellen als TCGF-abhängig angesehen werden. Dies war notwendig, da die T-Zellen bei einer ungenügenden Vorkultivierung Zellen enthalten konnten, die im Zusammenspiel mit relativ wenigen Monozyten (weniger als 1 % der Zellen) selbst TCGF produzieren konnten. Nur durch eine ausreichende Vorkultivierung konnten diese Effekte ausgeschaltet werden.

In der Abb. 34 ist das Ergebnis einer TCGF-Messung von zwei exemplarischen CASS-Überständen dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung wird die Reaktion der Zellen auf eine Verdünnungsreihe von Lymphocult gezeigt. Diese Verdünnungsreihe wurde bei jeder Messung für eine quantitative Beurteilung der Proben in den Meßkulturen als Standard und Positivkontrolle mitgeführt. Die Abbildung macht die Dosisabhängig-

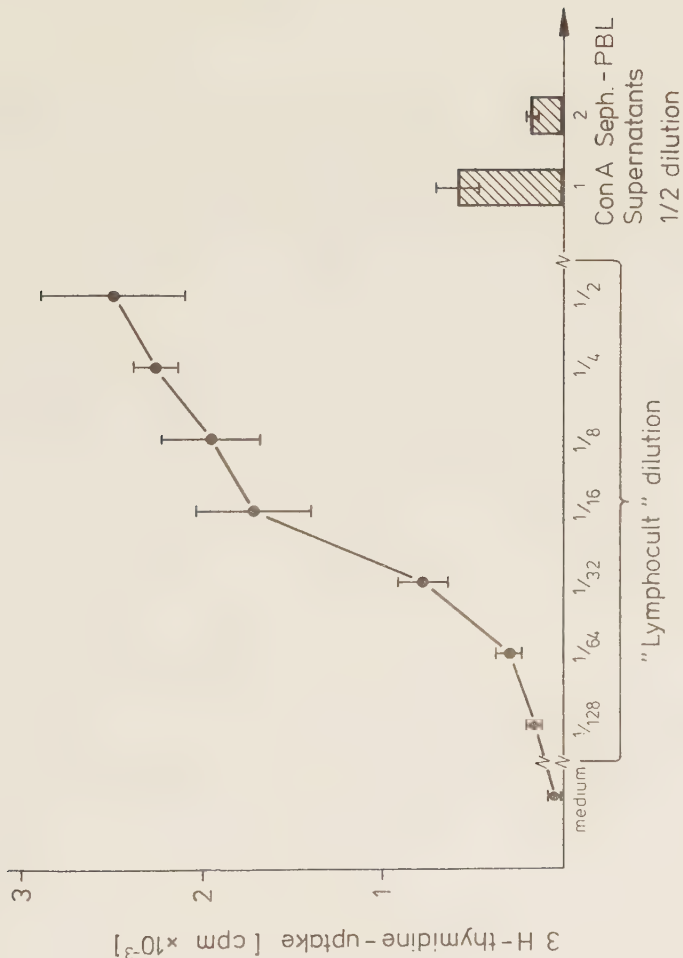


Abb. 34: Messung von TCGF

TCGF-abhängige T-Zellblasten ($1 \times 10^5/\text{ml}$) wurden in $100 \mu\text{l}$ Kulturen (Triplikate in 96-Lochplatten) mit den angegebenen Zusätzen (50 % CASS, 50 % Lymphocult-Verdünnung, s. X-Achse) kultiviert. $0,2 \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin in $10 \mu\text{l}$ wurde den Kulturen zwischen der 24. und 48. Stunde angeboten. In der Abbildung sind Mittelwerte von Triplikaten mit den Standardabweichungen angedeutet.

keit von TCGF-haltigem Lymphocult deutlich. Der Empfindlichkeitsbereich der Messung reichte bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 : 128.

Im rechten Teil der Abbildung sind die Reaktionen auf die CASS-Überstände dargestellt. Im Vergleich zu Lymphocult waren ihre Aktivitäten relativ gering. Sie erreichten 8 - 24 % der maximalen Aktivität durch Lymphocult. Ihre Aktivität entsprach etwa einer Lymphocultverdünnungsstufe von 1 : 128 bis 1 : 32. Die Messung von anderen Überständen ergab keine höheren Aktivitäten. Etwa 50 % von 30 ausgetesteten CASS hatten so wenig Aktivität, daß sie nicht signifikant über der Mediumkontrolle lagen.

3.7. Messung von B-Zellfaktoren

B-Zellen, die durch eine doppelte Rosettierung mit Schaferythrozyten von T-Zellen befreit waren, wurden als Testzellen für die Messung von Lymphokinen eingesetzt, die die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen einleiten und unterstützen konnten.

In dem vorliegenden System wurden die B-Zellen für zwei Tage mit 0,01 % (w/v) fixierten *Staphylococcus aureus* (Cowan I)-Zellen inkubiert (Protokoll nach Wrigley et al., 1983). Die dabei entstandenen Blasten wurden über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten aus Percoll isoliert (s. Abb. 6). In der Tab. 7 ist die Verteilung der Blasten und der nicht aktivierten, kleinen Zellen dargestellt. Eine grobe Einteilung war dabei durch die Morphologie der Zellen möglich. Die sogenannten kleinen Zellen hatten einen Durchmesser, der kleiner als 8 μm war. Deutlich zu unterscheiden davon waren die Blasten mit Durchmessern zwischen 12 und 16 μm . Im Phasenkontrastmikroskop konnten außerdem die abgestorbenen Zellen als "Ghosts" identifiziert werden. Die Fraktion mit den meisten Blasten sammelte sich in der Zwischenschicht zwischen 50 und 40 % Percoll an. Diese Zellen wurden für die Messung der Faktoren benutzt.

3.7.1. Optimierung der Proliferationsmessung

Die proliferative Leistung der B-Zellen konnte über die DNA-Synthese der B-Zellkulturen verfolgt werden. Als Maß für die DNA-Synthese wurde die Aufnahme von Thymidin in die Zellen gemessen. Eine Orientierung für das Zeitintervall, in dem der Thymidineinbau gemessen werden konnte, bot die Arbeit von Wrigley et al. (1983). Dort wurde das Thymidin zwischen den Stunden 24 und 48 nach der Faktorenzugabe der Zellen angeboten. Im vorliegenden System bewährte sich dieses Protokoll jedoch nicht. Die Stimulation durch aktive Überstände (wie PWM-Sup oder CASS bzw. CASS-Sup) waren recht gering;

Tab. 7: Isolierung von B-Zellblasten im diskontinuierlichen Percollgradienten

Fraktion	Dichte (g/ml)	kl. Zellen ($\times 10^5$ /ml)	Blasten	Ghosts
100 % Sediment	1,126	< 0,1	< 0,1	< 0,1
100 - 60 % Schicht	1,126 - 1,080	9	1	< 0,1
60 - 50 % Schicht	1,080 - 1,068	4	2	< 0,1
50 - 40 % Schicht	1,068 - 1,056	0,2	10	< 0,1
40 - 30 % Schicht	1,056 - 1,044	< 0,1	0,2	0,6
30 - 0 % Schicht	1,044 - 1,099	< 0,1	< 0,1	2

$5 - 6 \times 10^6$ voraktivierte B-Zellen wurden im diskontinuierlichen Percollgradienten (s. Abb. 6) zentrifugiert. Die einzelnen Zwischenschichten wurden isoliert und gezählt.

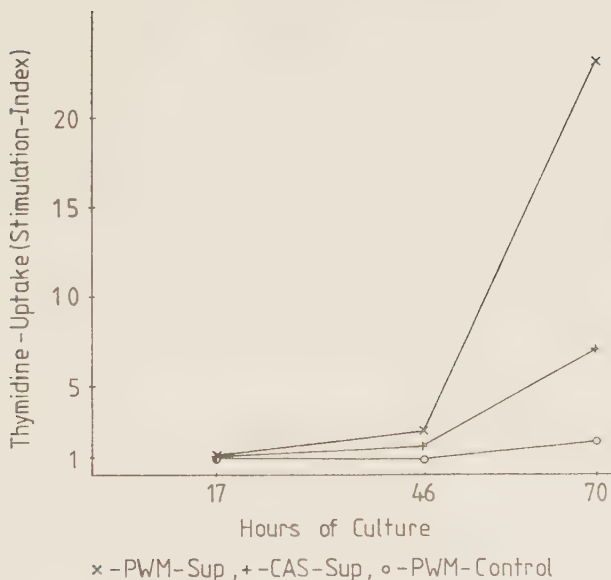


Abb. 35: Optimierung der Proliferationsmessung

SAC-voraktivierte B-Zellblasten ($1 \times 10^5/\text{ml}$, 150 μl Kulturvolumen, Triplikate in 96-Lochplatten) wurden mit 33 % PWM-Sup, CASS und PWM-Kontrolle für unterschiedliche Zeiten (s. X-Achse) kultiviert. Für die jeweils letzten 16 h wurde die Kultur mit 0,5 μCi H-3-Thymidin inkubiert und der Thymidineinbau bestimmt. Die Einbauraten wurden als Stimulationsindex (bezogen auf die Mediumkontrolle) aufgetragen. Die Standardabweichungen der Meßwerte war kleiner als 10 %.

die Stimulationsindizes erreichten maximal Werte um 3. Aus diesem Grund wurden in einem Versuch unterschiedliche Inkubationszeiten für das Thymidin gewählt. SAC-aktivierte B-Zellblasten wurden in einer Dichte von $1 \times 10^5/\text{ml}$ in einem Kulturvolumen von insgesamt 150 μl (in 96-Lochplatten) in der Anwesenheit von 33 % (v/v) PWM-Sup, CAS-Sup, PWM-Kontrolle (die PWM-Konzentration entsprach der des PWM-Sup) und Kulturmedium als Kontrollen kultiviert. In parallelen Ansätzen wurde Thymidin zu unterschiedlichen Zeitpunkten den jeweils 16 letzten Stunden angeboten.

In der Abb. 35 ist das Ergebnis dieses Experimentes dargestellt. Auf der X-Achse ist der Zeitpunkt der Zellernte dargestellt. Der Stimulationsindex errechnete sich aus dem Verhältnis zum Mediumkontrollwert. Das Experiment macht deutlich, daß die Stimulation der B-Zellblasten durch aktive Überstände zur 70. Stunde stark ansteigt. Der PWM-Sup erreicht einen Index über 20, CAS-Sup etwa 5. Die PWM-Kontrolle bleibt nahezu bei 1. Sie macht deutlich, daß durch PWM alleine kein Thymidineinbau stimuliert wird. Außerdem ist die fehlende Stimulation durch PWM eine Kontrolle für die Sauberkeit der B-Zellpräparation. T-Zellen würden auf den PWM-Stimulus mit einer Proliferation reagieren können.

3.7.2. Messung der Immunglobulinproduktion

Die Kulturen der B-Zellblasten bestanden aus Zellen, die auf einen Stimulus hin mit Proliferation und Ausdifferenzierung zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen reagieren sollten. Beide Parameter wurden in parallelen Ansätzen gemessen. Die Ansätze waren identisch. Da mit den auszutestenden Faktoren (PWM-Sup oder CASS) Immunglobuline von Anfang an mit hineingebracht wurden, wurden zellfreie Parallelen bei der Messung der Produktion mit berücksichtigt. In der Abb. 36 sind die zellfreien Kontrollen mit dargestellt worden. Die Länge der Balken gibt die Ig-Konzentration in den Überständen

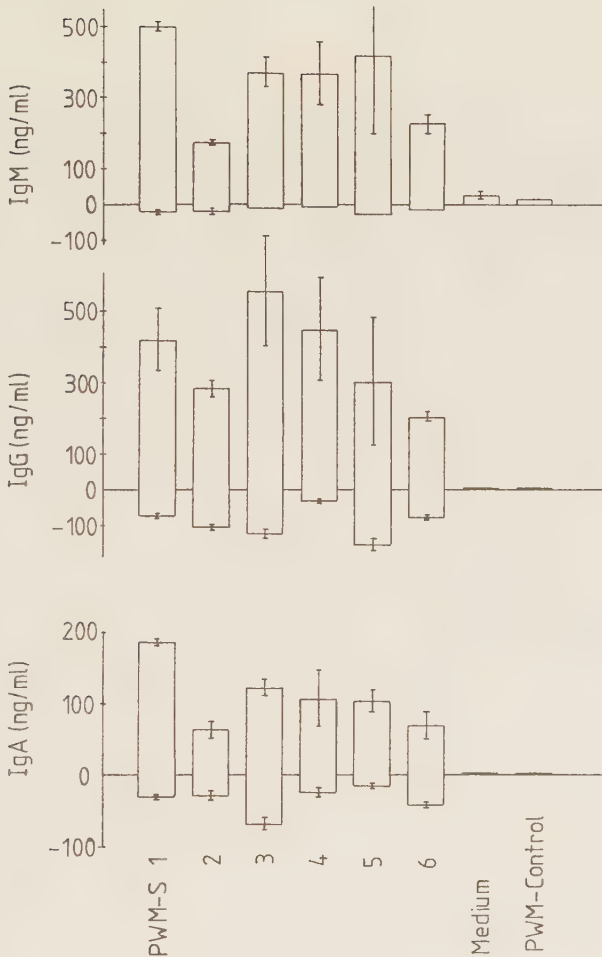


Abb. 36: Immunglobulinproduktion im isolierten B-Zellsystem

SAC-voraktivierte B-Zellen ($1 \times 10^5/\text{ml}$, 150 μl Kulturvolumen, Triplikate in 96-Lochplatten) wurden mit 33 % PWM-Sup von sechs verschiedenen Spendern bzw. PWM-Kontrollen für fünf Tage kultiviert, die Ig-Konzentrationen wurden im Überstand gemessen. Die Konzentrationen sind in der absoluten Länge der Säulen abzulesen. Der Anteil der Ig-Konzentrationen, die vorher in den PWM-Sups enthalten waren, wurde als negativer Anteil unterhalb der Abszisse eingezeichnet. Der Säulenanteil oberhalb der Abszisse gibt den Netto-Anteil der neu produzierten Ig-Menge an.

der B-Zellkulturen an. Die Balken wurden jedoch so gezeichnet, daß die Konzentrationen der zellfreien Kontrollen unterhalb der X-Achse liegen. Der Balkenanteil oberhalb der X-Achse gibt somit die Differenz der beiden Konzentrationen an. Dieser Wert ist auf die neugebildeten Immunglobuline zurückzuführen. In allen folgenden Darstellungen wurden derartig korrigierte Ig-Werte angegeben. Aus Gründen der Fehlerfortpflanzung mußten allerdings die Standardabweichungen von dem Kulturwert und der Leerkontrolle addiert werden, so daß der Fehler in manchen Fällen recht groß wurde. In der vorliegenden Abb. 36 sind die Aktivitäten von sechs verschiedenen PWM-Überständen dargestellt. Gemessen wurde die IgM-, IgG- und IgA-Produktion. Die B-Zellblasten wurden in einer Dichte von $1 \times 10^5/\text{ml}$ mit 33 % Überstand für fünf Tage kultiviert. Die unterschiedlichen Aktivitäten der sechs Überstände spiegeln möglicherweise die spenderspezifischen Eigenheiten wieder. Diese Differenzen zwischen den einzelnen PWM-Sups können allerdings auch experimentell begründet sein. Die Differenzen machen sich hauptsächlich in der Höhe der Aktivität bemerkbar. Isotypenspezifische Effekte sind nicht festzustellen. Die hohe Standardabweichung der Ig-Produktionsmessung läßt es nicht zu, den PWM-Sups individuelle Unterschiede in den Verhältnissen der Isotypen zuzuordnen. Ohne Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung ergeben sich folgende Verhältniszahlen:

Tab. 8:

PWM-Sup	IgM	:	IgG	:	IgA
1	1		0,85		0,37
2	1		1,65		0,37
3	1		1,51		0,33
4	1		1,21		0,29
5	1		0,71		0,25
6	1		0,96		0,32
Mittelwert:	1		1,15		0,32
Standardabw.:			0,38		0,05

Die großen Schwankungen in den Verhältnissen IgM : IgG können durch den großen Fehler der IgG-Produktionsmessung erklärt werden. Bei der IgA-Produktion, die einen relativ kleinen Meßfehler aufwies, waren die Verhältnisse IgM : IgA weniger großen Schwankungen unterworfen. Die Mittelwerte der Verhältnisse sind anscheinend in erster Linie von der Testkultur abhängig. Die Generierung isotypenspezifischer Differenzierungsfaktoren durch PWM bei der Überstandsgewinnung ist bei den sechs getesteten Überständen nicht auffällig unterschieden. Der Vergleich der Proliferation und der Ig-Produktion der kultivierten B-Zellblasten läßt sich ebenfalls in Verhältniszahlen ausdrücken:

Tab. 9: Verhältnis Thymidineinbau zu Ig-Produktion

PWM-Sup	Thymidin- einbau	:	IgM (ng Ig/ml)	:	IgG (ng Ig/ml)	:	IgA (cpm)
1	1		0,17		0,14		0,063
2	1		0,08		0,13		0,030
3	1		0,14		0,20		0,045
4	1		0,19		0,22		0,054
5	1		0,26		0,19		0,065
6	1		0,18		0,17		0,056
Mittelwert:	1		0,17		0,18		0,052
Standardabw.:	-		$\pm$ 0,06		$\pm$ 0,04		$\pm$ 0,012

Die Werte zeigen eine gewisse Konstanz im Verhältnis Thymidineinbau zur Ig-Produktion. Beim PWM-Sup 2 liegt allerdings ein Übergewicht der Proliferation unterstützenden Aktivität (BCGF) vor. Die Verhältniszahlen liegen alle an der unteren Grenze. Bei diesem Überstand ist weiterhin auffällig, daß relativ viel IgG im Verhältnis zu IgM in der Testkultur induziert wurde (s. Tab. 8). Im Gegensatz zu diesem Überstand lag beim PWM-Sup 5 das Übergewicht der Aktivität bei der IgM- und IgA-

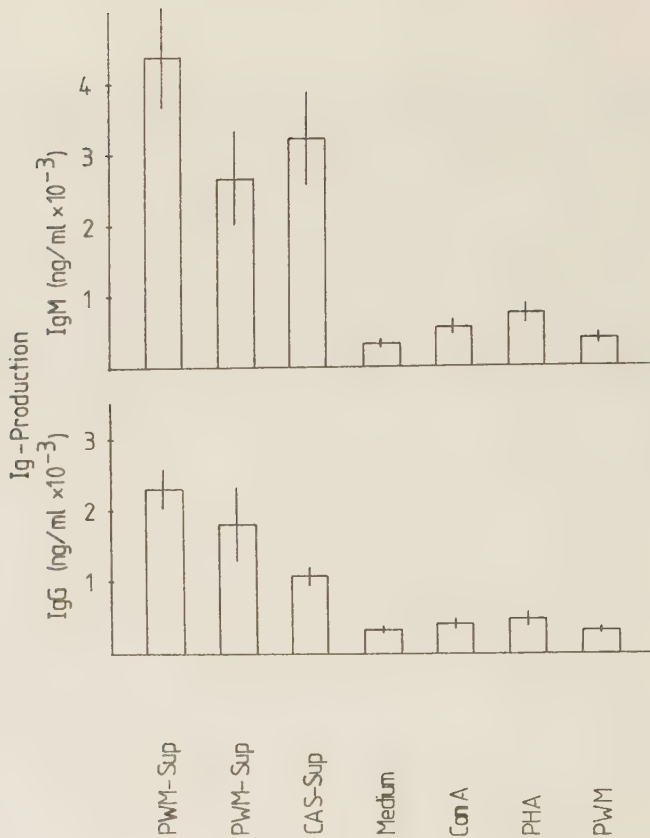


Abb. 37: Immunglobulinproduktion im isolierten B-Zellsystem

SAC-voraktivierte B-Zellblasten (1×10^5 /ml, 150 μ l Kulturvolumen, Triplikate in 96-Lochplatten) wurden fünf Tage mit 33 % Faktor (2 x PWM-Sup, CASS) bzw. Lektin- und Mediumkontrolle (1 μ g PHA/ml, 1 μ g ConA/ml, 0,67 μ g PWM/ml) kultiviert. Ig-Konzentrationen wurden in den Überständen gemessen. Die Ig-Konzentrationen der getesteten Faktoren wurde von der Brutto-Produktion abgezogen, die Standardabweichungen (senkrechte Balken in den Säulen) der Leerkontrolle und der Kultur wurden summiert.

Produktion. Bei der Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung ist der letztere Effekt allerdings statistisch nicht abzusichern.

Auch die Überstände der ConA-Sepharose aktivierten PBL-Kulturen hatten in der B-Zellblastenkultur eine Aktivität zur Induktion der Ig-Produktion. In der Abb. 37 ist die Aktivität von einem CASS-Überstand mit zwei unterschiedlichen PWM-Sups verglichen. Zusätzlich sind Kontrollen mit ConA, PHA, PWM und Medium dargestellt. Auch CASS weist eine Aktivität auf, die die Blasten ausdifferenziert und zur Ig-Produktion bringt. In der Abbildung sind zusätzlich die Effekte der Kontrollen dargestellt. ConA, PHA und PWM können alleine keine Differenzierung der B-Zellen unterstützen. Ihre Wirkung unterscheidet sich nicht von dem Effekt, der durch Medium alleine ausgeübt wird.

3.7.3. Einfluß der Zelldichte

Für die Etablierung der Messung von B-Zellfaktoren mit SAC-aktivierten B-Zellblasten war es wichtig zu wissen, in welcher Dichte ein Nachweis der Faktoren noch möglich war. Die aktivierten Blasten wurden in unterschiedlichen Dichten mit PWM-Sup und PWM als Kontrolle inkubiert. Die Anzahl der Zellen pro 150 µl Kultur wurden in einer logarithmischen Verdünnungsreihe (mit $3 \times 1 : 3$ Verdünnungsstufen) eingesetzt. Der Anteil der Zusätze betrug 33 %. Der Thymidineinbau wurde zwischen der 56. und 70. Stunde bestimmt (0,5 µCi/Kultur). Die Überstände der Kulturen wurden am fünften Tag für die Messung der Immunglobuline geerntet. Die Ergebnisse des Experimentes sind in der Abb. 38 dargestellt. Die Kreuze geben die Aktivität eines PWM-Sups wieder. Die Kreise zeigen die Effekte der PWM-Kontrolle. Der Thymidineinbau wurde sinnvollerweise als Stimulationsindex angegeben. Als Bezugswert galt dabei die Mediumkontrolle.

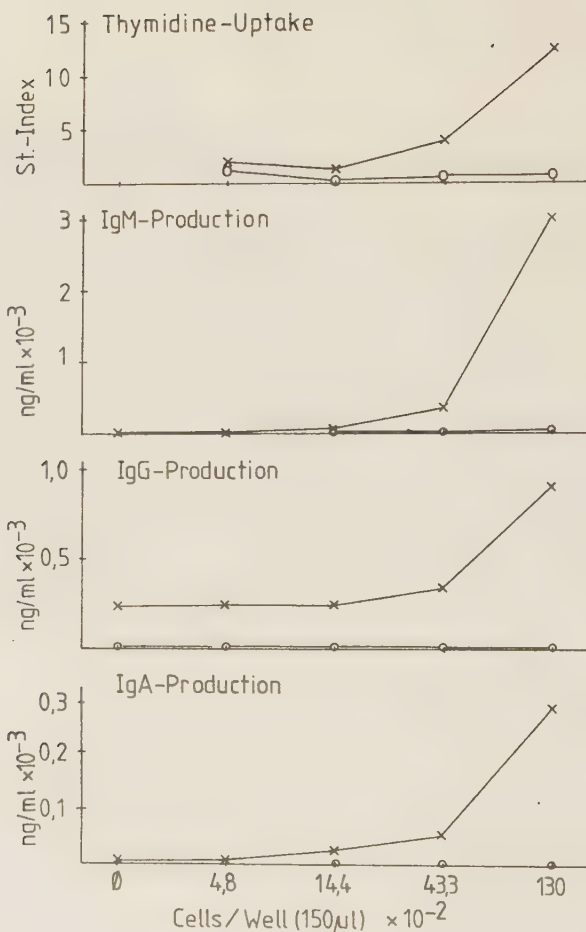


Abb. 38: Einfluß der Zelldichte auf das B-Zellsystem

SAC-voraktivierte B-Zellen wurden in verschiedenen Zelldichten (s. X-Achse) mit PWM-Sup (X--X) und PWM-Kontrolle (O--O) in 150 μ l Kulturen (Triplikate in 96-Lochplatten) kultiviert. Der Thymidineinbau wurde zwischen der 56. und 70. Stunde mit 0,5 μ Ci H-3-Thymidin bestimmt und als Stimulationsindex bezogen auf die Mediumkontrolle angegeben.

Die Immunglobulinkonzentrationen wurden am fünften Tag in den Kulturüberständen gemessen. Die Standardabweichungen waren kleiner als 10 %.

Die Resultate der Ig-Produktionen zeigen bei IgM, IgG und IgA gleichermaßen einen Anstieg der Reaktion bei einer Zellzahl zwischen 1440 und 4330 Blasten pro 150 μ l Kultur. Das entspricht einer Dichte von $0,96 - 2,89 \times 10^4$ Zellen pro ml. In der Regel wurden bei den Messungen der B-Zellfaktoren Dichten von $1 - 2 \times 10^5$ /ml eingehalten. Sie entsprechen hier etwa der größten Zelldichte. Die Empfindlichkeit der Messung liegt, wie gezeigt, jedoch noch unter dieser Zelldichte. Von Bedeutung ist dieses Erkenntnis, da die Präparation von SAC-aktivierten B-Zellblasten außerordentlich verlustreich ist. Von den 200×10^6 PBL einer 200 ml Blutspende bleiben nach der Präparation nur $0,3 - 2,0 \times 10^6$ Blasten übrig. Diese Zellmengen reichen für 30 - 200 Mikrokulturen. Da für Thymidineinbau und Ig-Produktion parallele Kulturen notwendig sind und normalerweise Triplikate angelegt wurden, war diese Zahl noch durch sechs zu teilen, um auf die Anzahl der möglichen Meßansätze zu kommen.

Der Stimulationsindex des Thymidineinbaus war ebenfalls von der Zelldichte abhängig. Da durch die Berechnung der Stimulation ein Verhältnis zwischen den Thymidineinbausraten der stimulierten Kultur und der Kontroll-Kultur angegeben wird, war nicht zu erklären, warum dieses Verhältnis von der Zellzahl abhängig sein sollte. Es war jedoch anzunehmen, daß zum Zeitpunkt der Messung des Thymidineinbaus (56. - 70. Stunde) bereits eine Veränderung der Zellpopulationen stattgefunden hatte. Es erscheint möglich, daß die Anzahl der reagierenden B-Zellblasten im PWM-Sup zunahm und/oder in der Kontrollkultur abnahm. Diese Dynamik konnte sich in den ersten 56 Stunden abspielen.

Die Schlußfolgerung aus diesem Experiment ist, daß für die Messung der B-Zellfaktoren Zelldichten von $1 - 2 \times 10^5$ /ml geeignet sind. Die Grenzen für die Nachweisbarkeit mögen individuell verschieden sein. Die späteren Experimente bestätigen, daß Kulturen mit Zelldichten unter den hier angegebenen nur in wenigen Fällen auswertbar waren.

3.7.4. Vergleich von CASS und PWM-Sup

Die Ergebnisse der oben geschilderten Experimente mit isolierten B-Zellblasten deuteten an, daß die gemessenen Ig-Produktionen sowohl von der Testkultur als auch von dem aktiven Überstand abhängig waren. Das Reaktionsmuster von zwei verschiedenen Überständen (CASS und PWM-Sup) wurde bei zwei verschiedenen Testkulturen gemessen. In den Abb. 39 und 40 ist als Maß der Reaktion der Testkultur der Stimulationsindex dargestellt worden. Dieser Index berechnet sich aus dem Verhältnis der Überstand-induzierten Ig-Menge zur Mediumkontrolle (spontane Ig-Produktion).

Experiment 1 zeigt das Ergebnis der ersten Testkultur, Experiment 2 das der zweiten Kultur. In der Abb. 39 ist die Stimulation durch PWM-Sup, in der Abb. 40 die Stimulation durch CASS dargestellt. Bei allen gemessenen Isotypen war im Exp. 1 durch PWM-Sup eine Stimulation mit dem Faktor 6 - 8 möglich. Derselbe Überstand zeigte im Exp. 2 jedoch isotypenspezifische Unterschiede in der Stimulationsrate. Die Stimulation für IgM und IgG lag zwischen 10 und 15, für IgA war dagegen gar keine Stimulation festzustellen. Die Aktivität von CASS (Abb. 40) war in beiden Experimenten isotypenspezifisch verschoben. Im Gegensatz zum PWM-Sup lag hier das Hauptgewicht der Aktivität bei der Stimulation der IgM-Produktion. Die Stimulationsfaktoren lagen etwa zwischen 10 und 12, die Stimulation der IgG-Produktion lag wesentlich niedriger. Der Faktor lag bei 3 bzw. 5. Im ersten Experiment zeigte CASS eine IgA-Stimulation von etwa 3, im zweiten Experiment war wie beim PWM-Sup keine Stimulation zu messen.

Die Ausführungen machen deutlich, CASS und PWM-Sup können unterschiedliche Aktivitäten mit isotypenspezifischem Charakter aufweisen. Ob die gezeigten Unterschiede zwischen beiden Überständen auf die Art der Generierung oder den Spender der PBL zurückzuführen ist, konnte dieses Experi-

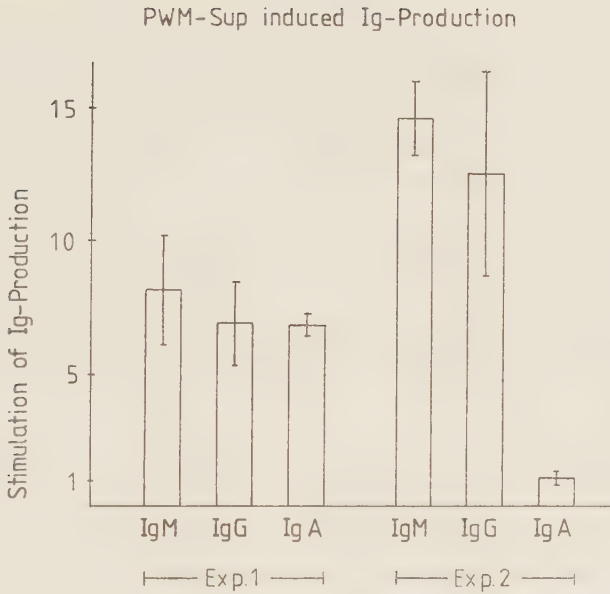


Abb. 39: Individuelle Reaktionen auf PWM-Sup im
isolierten B-Zellsystem

SAC-voraktivierte B-Zellen von zwei verschiedenen Spendern (Exp. 1, Exp. 2) wurden in einer Dichte von 1×10^5 /ml (150 μ l Kulturen, Triplikate in 96-Lochplatten) mit 33 % PWM-Sup für fünf Tage kultiviert. Die korrigierte Netto-
produktion (s. Abb. 36) wurde als Stimulationsindex, bezogen auf die Mediumkontrolle, aufgetragen.

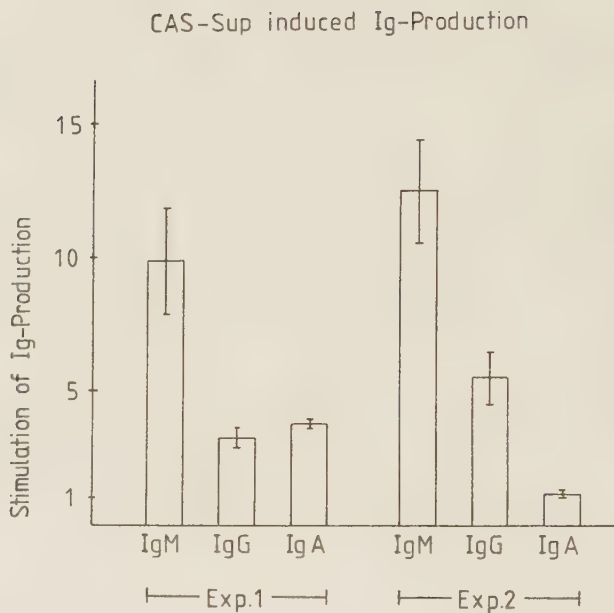


Abb. 40: Individuelle Reaktion auf CASS im isolierten B-Zellsystem

Legende s. Abb. 39.

Anstelle von PWM-Sup wurde CASS eingesetzt.

ment nicht zeigen. Als zweiter Effekt war die fehlende Stimulation der IgA-Produktion im zweiten Experiment zu verzeichnen. Beide Überstände, die in der ersten Testkultur die IgA-Produktion stimuliert hatten (Stimulationsfaktor 3 bzw. 7), konnten die IgA-Produktion der zweiten Testkultur überhaupt nicht stimulieren.

Dieses Ergebnis demonstriert das Zusammenwirken der einzelnen Komponenten des Systems der Ausdifferenzierung. Sowohl die Blastenpopulation als auch die Faktoren der Überstände bestimmen das Ausmaß und die Art der isotypenspezifischen Reaktion.

3.7.5. Einfluß von CASS auf die durch Faktoren aktivierte B-Zell-Proliferation und Ig-Produktion

Die Faktoren des CASS-Überstandes hatten in der PWM-induzierten Immunglobulinproduktion von PBL-Kulturen eine suppressive Wirkung. Um den Angriffspunkt dieser Suppression weiter zu untersuchen, wurde CASS im isolierten B-Zellsystem ausgetestet, das durch Faktoren zur Proliferation und Ig-Produktion gebracht wurde. Zu diesem Zweck wurde CASS (33 % v/v) zusammen mit PWM-Sup (33 %) SAC-aktivierten B-Zellen in der Kultur angeboten. Der Thymidineinbau (54. - 72. Stunde) und die Ig-Produktion (5 d) wurde, wie bereits beschrieben, gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Wirkung von CASS auf proliferierende und differenzierende B-Zellen

	Thymidineinbau (cpm)	IgM (ng/ml)	IgG (ng/ml)
PWM-Sup	8337 $\pm$ 98	549 $\pm$ 99	196 $\pm$ 24
CASS	943 $\pm$ 38	259 $\pm$ 32	76 $\pm$ 14
PWM-Sup+CASS	8310 $\pm$ 1322	561 $\pm$ 39	191 $\pm$ 46
Kulturmedium	277 $\pm$ 70	39 $\pm$ 6	15 $\pm$ 7
PWM-Kontrolle	511 $\pm$ 254	46 $\pm$ 13	13 $\pm$ 5

Die Ergebnisse machen deutlich, daß CASS in der Kombination mit PWM-Sup keine Suppression auf die gemessenen B-Zellfunktionen ausübt. Die Suppression des gleichen CASS hatte in der PWM-induzierten IgMG-Produktion von gemischten PBL-Kulturen eine starke supprimierende Wirkung. Die Suppression lag da zwischen 60 und 80 % bei drei verschiedenen Testkulturen. Durch die Abwesenheit der T-Zellen im isolierten B-Zellsystem kann CASS offensichtlich keine Suppression mehr ausüben. Das Ergebnis schließt einen direkten, supprimierenden Effekt auf B-Zellen durch die CASS-Faktoren aus. Auffällig ist bei diesem Experiment jedoch, daß sich die Wirkung von PWM-Sup durch die Helferfaktoren von CASS nicht weiter steigern können. Eine Erklärung wäre, daß die Funktionen der B-Zellen durch den PWM-Sup maximal stimuliert wurden, so daß eine weitere Steigerung nicht mehr möglich war. Dies würde voraussetzen, daß CASS auch qualitativ nicht mehr Helferfaktoren als der verwendete PWM-Sup enthält. Dieses Experiment wurde in der Tendenz dreimal bestätigt. Zusammengefaßt bedeutet dies: CASS kann die B-Zelldifferenzierung im isolierten System nicht inhibieren.

3.7.6. Einfluß der Dialyse auf die Helferaktivität der verwendeten Überstände CASS und PWM-Sup

PWM-Überstände von PBL-Kulturen (3×10^6 /ml, 2 µg PWM/ml, 24 h) unterstützen die Proliferation von SAC-aktivierten B-Zellen und leiten die Ig(M, G, A)-Produktion ein. Gleiche Effekte, jedoch in einem geringeren Ausmaß, konnten durch die ConA-Sepharose induzierten PBL-Überstände (CASS) erzielt werden. Um die ungefähre Größe der dafür verantwortlichen Moleküle abzugrenzen, wurden die Überstände bei einer nominalen Trenngröße von MG = 5000 gegen RPMI kontinuierlich unter Überdruck dialysiert. Kulturmedium wurde zur Kontrolle ebenfalls auf die gleiche Weise dialysiert, um zu überprüfen, ob relevante Bestandteile des FCS-haltigen Kulturmediums durch die Dialyse entfernt wurden. Die Effizienz der Dialyse lag dabei nach der theoretischen Berechnung über 99 %. Die Produkte der Dialyse wurden im Testansatz mit ihren Ausgangslösungen verglichen. Gemessen wurde die Proliferation (Thymidineinbau: 56. - 72. Stunde) der B-Zellblasten und die Ig-Produktion nach fünf Tagen. Die Zelldichte betrug $0,8 \times 10^6$ /ml bzw. $1,2 \times 10^4$ /well. Die Ergebnisse für die Dialyse von PWM-Sup sind in der Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Dialysierter PWM-Sup

	Thymidineinbau (cpm)	IgM (ng/ml)	IgG (ng/ml)
PWM-Sup	742 ± 4	79 ± 19	66 ± 19
dial. PWM-Sup	611 ± 29	70 ± 20	65 ± 12
Kulturmedium	206 ± 57	< 3	< 10
PWM-Kontrolle	77 ± 18	< 3	< 10

Durch die Dialyse des Überstandes wird die Proliferation der Blasten um etwa 18 % reduziert. Diese Reduktion ist jedoch bei Wiederholungen des Experimentes nicht zu bestätigen. Es ist aber nicht auszuschließen, daß bei der Dialyse ein geringer Anteil der Aktivität durch Absorption an der Dialysemembran verlorengeht. Die BCGF-Aktivität scheint aber nicht dialysierbar zu sein. Dafür ist der Reduktionseffekt zu gering. Eine Reduktion der BCDF-Aktivität scheint durch die Dialyse ebenfalls nicht stattgefunden zu haben. Die Ig-Produktionsraten der ausdifferenzierten Plasmazellen wird durch die Dialyse des PWM-Sup nicht verändert. Auch diese Beobachtung bestätigt sich in mehreren Wiederholungen der Austestung. Die Effekte der Dialyse von CASS und Kulturmedium sind in der Tab. 12 dargestellt:

Tab. 12: Dialyse von CASS und Kulturmedium

	Thymidineinbau (cpm)	IgM (ng/ml)	IgG (ng/ml)
CASS	674 $\pm$ 125	129 $\pm$ 8	40 $\pm$ 15
dial. CASS	943 $\pm$ 38	259 $\pm$ 32	76 $\pm$ 14
Kulturmedium	277 $\pm$ 70	39 $\pm$ 6	15 $\pm$ 7
dial. Kulturmedium	595 $\pm$ 85	46 $\pm$ 5	21 $\pm$ 7
PWM-Sup	8954 $\pm$ 984	474 $\pm$ 29	166 $\pm$ 76
PWM-Kontrolle	254 $\pm$ 115	46 $\pm$ 13	13 $\pm$ 5

Bei der Dialyse von CASS wird beobachtet, daß sowohl die BCGF-als auch die BCDF-Aktivität durch die Dialyse gesteigert wird. Ein ähnlicher Effekt ist auch bei der Dialyse des FCS-haltigen Kulturmediums zu beobachten. Thymidineinbau und Ig-Produktion werden gesteigert, wenn Kulturmedium und CASS

dialysiert werden. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß bei beiden Lösungen inhibierende Faktoren durch die Dialyse entfernt wurden. Da dieser Effekt auch beim Kulturmedium auftrat, konnte es sich vermutlich um Faktoren des FCS handeln, die auf die B-Zelldifferenzierung in der Kultur einen störenden Einfluß ausübten. Welcher Art dieser Einfluß war, konnte nicht weiter verfolgt werden. Auffällig war jedoch, daß durch die Dialyse des PWM-Sup (s. Tab. 11) keine Steigerung der Helferaktivitäten erreicht wurde. Möglicherweise war hier die maximale Aktivität durch den Überstand erreicht, und diese Aktivität konnte durch die Anwesenheit von inhibierenden FCS-Faktoren nicht reduziert werden.

Als Schlußfolgerung dieser Versuche muß folgendes festgehalten werden:

1. Die BCGF- und BCDF-Aktivität der eingesetzten Überstände ist bei einer Trenngröße von $MG = 5000$ nicht dialysierbar.
2. FCS enthält dialysierbare Faktoren, die in der B-Zellkultur inhibierend wirken. Ob dieser Effekt spezifisch oder unspezifisch ist, bleibt dabei offen.

Um eine maximale Reaktion in der B-Zellkultur zu beobachten, wäre es empfehlenswert, zu versuchen, FCS durch definierte Mediumbestandteile zu ersetzen und in serumfreien Systemen auch bei der Überstandsherstellung zu arbeiten.

4. Diskussion

Die vorgelegte Arbeit hat in einer Reihe von Experimenten Grundlagen der humanen B-Zelldifferenzierung in vitro erarbeitet. Zunächst wurde dabei von Lymphozytenkulturen ausgegangen, die polyklonal mit Pokeweed Mitogen (PWM) stimuliert wurden. In einem anderen Abschnitt konnte die Entwicklung der sezernierenden Plasmazellen in definierten Kultursystemen mit Hilfe von isolierten B-Zellen und Helferfaktoren dargestellt werden. Besondere Beachtung fand dabei die isotypenspezifische B-Zelldifferenzierung. Eine Serie von Experimenten untersuchte den Mechanismus von Suppressionsfaktoren, die in der Kultur hinsichtlich der Ig-Produktion eine regulatorische Inhibition ausüben.

In der folgenden Diskussion soll auf die wesentlichen Resultate der Arbeit hingewiesen werden. Es wird versucht, die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Literatur zu interpretieren und Modelle für die B-Zelldifferenzierung zu erarbeiten. Folgende Punkte werden dabei aufgegriffen:

1. Die Gültigkeit der Meßmethoden (isotypenspezifische RIAs).
2. Parameter der polyklonalen Ig-Stimulierung im PWM-System.
3. Der Mechanismus der Suppression durch lösliche Faktoren.
4. Die ausbleibende Stimulierung der IgE-Produktion.
5. Die Kulturbedingungen für ein isoliertes B-Zellsystem.

4.1. Messung der Immunglobulinklassen im RIA

4.1.1. Die Empfindlichkeit des RIA

Die vorliegende Arbeit hatte sich das Ziel gesetzt, die isotypenspezifische Ausbildung von Plasmazellen in vitro zu untersuchen. Von besonderer Bedeutung war dabei die Messung der neu produzierten Immunglobuline in den Überständen von Lymphozytenkulturen. Die Immunglobulinklassen IgM, IgG, IgA und IgE waren mit Hilfe von radioimmunologischen Methoden

meßbar. Die Meßgrenze lag etwa zwischen 0,05 und 0,2 ng/ml. Diese Empfindlichkeit reichte für die Messung von Ig (M, G, A) in den Kulturüberständen aus. Die Konzentrationen dieser Isotypen lag in den meisten Fällen über 10 ng/ml. Die IgG- und IgM-Konzentrationen erreichten bei optimal stimulierten Kulturen Werte über 1000 ng/ml, so daß die Kulturüberstände für die Messungen 1 : 10 bis 1 : 50 verdünnt werden mußten, um nicht in den Sättigungsbereich der Standardkurve zu fallen. Für die Messung von IgE dagegen mußten die Kulturüberstände verdünnt im RIA eingesetzt werden. Die Konzentrationen in den Kulturen lagen hier meist unter 1 ng/ml. Da in diesem Bereich noch kein linearer Anstieg der Eichkurve zu verzeichnen war, mußte ein relativ hoher Meßfehler in Kauf genommen werden. Bei der Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml war eine Ungenauigkeit von 15 - 20 % möglich. Bei anderen Autoren lagen die Empfindlichkeiten der Messung in der gleichen Größenordnung:

Matsumoto 1981	121 pg/ml
Turner 1981	40 pg/ml
Geha 1983	50 - 150 pg/ml
Zuraw 1981	50 - 100 pg/ml
Saryan 1983	50 - 150 pg/ml
Fraser 1979	50 pg/ml
Buckley 1981	50 pg/ml
Spiegelberg 1983	235 pg/ml
Hovmark 1981	500 pg/ml

4.1.2. Die Spezifität des IgE-RIA

Eine große Bedeutung hatte die Spezifität der Meßmethode. Gerade bei den großen Konzentrationsunterschieden zwischen IgE und Ig (M, G, A) in den Überständen war die Kontrolle der Kreuzreaktion unabdingbar. IgG- und IgM-Konzentrationen von stimulierten Kulturen waren oft 1000 bis 10000-mal höher als die korrespondierenden IgE-Werte. Weder mit monoklonalen Standards noch mit Überständen aktivierter Kulturen konnte eine Kreuzreaktion im IgE-RIA nachgewiesen werden, so daß

die Nachweismethode als hochspezifisch angesehen werden mußte. Kreuzreaktionen sind denkbar, wenn die benutzten Antikörper gegen die leichten Ketten des IgE oder gegen F(ab)-Abschnitte des IgE gerichtet sind. Spiegelberg et al. (1983) diskutierten die Möglichkeit, daß idiotypische Abschnitte von IgG und IgE kreuzreagieren. Nach ihrer Meinung könnte möglicherweise IgG die Gegenwart von IgE in manchen Proben vortäuschen. Als Konsequenz schlagen die Autoren vor, monoklonale Antikörper gegen IgE zu verwenden.

In der vorliegenden Arbeit sprach vieles gegen die oben erwähnten Kreuzreaktionen bei den benutzten Antikörpern. Die gemessenen IgE-Konzentrationen zeigten keine Abhängigkeit von den manchmal sehr hohen IgG-Konzentrationen in den gleichen Proben. Die Spezifität der Antikörper war durch Affinitätschromatographie und Absorptionen mit irrelevanten Immunglobulinen erreicht worden. Die Reaktion der hochspezifischen Antikörper mit IgE ist nicht auf einzelne Determinanten des IgE beschränkt. Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen IgE-Determinanten fehlen bislang noch ausreichende Informationen über die Verteilung von möglichen Subtypen des IgE. Die Verwendung von hochspezifischen, polyklonalen Antikörpern erscheint deshalb vorteilhafter, da hier eine ausgewogene Reaktion mit den möglichen Subtypen gewährleistet ist.

Nicht in allen Veröffentlichungen, in denen die IgE-Konzentration in PBL-Kulturüberständen gemessen wurde, ist ein Spezifitätsnachweis erwähnt worden. Viele positive Reaktionen der PBL-Kulturen auf PWM könnten theoretisch im Sinne von Spiegelberg et al. (1983) durch kreuzreagierendes IgG oder IgM erklärt werden. Eine Überprüfung dieser Hypothese wäre von großem Interesse und ließe sich durch den Austausch von Proben erreichen.

Die Interpretation widersprüchlicher Ergebnisse hinsichtlich der Kulturansätze gestaltet sich schwierig, da

1. jedes Labor unterschiedliche Kulturbedingungen etabliert,
2. nicht wie im Tiersystem standardisierbare Spenderkollektive zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Erkenntnisse aus den durchgeführten IgE-Messungen: Die Empfindlichkeit des hochspezifischen IgE-RIAs war für die Überstände von Kulturen allergischer Spender ausreichend. Allerdings lagen die IgE-Konzentrationen in den Kulturen von gesunden Spendern in den meisten Fällen unter der Nachweisgrenze von 200 pg/ml und konnten nicht berücksichtigt werden. Für die Messung dieser Überstände wäre mindestens eine 10-fache Erhöhung der Empfindlichkeit notwendig. Hier müßte ein völlig neues Meßverfahren entwickelt werden.

4.2. Bedingungen für die PWM-stimulierte Ig-Produktion

Die vorgelegten Resultate machen deutlich, daß die PWM-stimulierte Ig-Produktion von ungetrennten PBL-Kulturen ein komplexer Vorgang ist, der durch mehrere Parameter der Kultur beeinflußt werden kann. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die verschiedenen Subpopulationen der T-Zellen sowie Makrophagen/Monozyten an der Stimulation beteiligt. Die Induktion der Ig-Produktion ist vom ausgewogenen Zusammenspiel der regulatorischen T-Zellen und den reagierenden B-Zellen abhängig. In den experimentellen Systemen ist sie auf geeignete Kulturbedingungen angewiesen. Die Resultate zeigen, daß die Stimulation der Ig (M, G, A)-Produktion abhängig von der PWM-Konzentration, der Zelldichte und den individuellen Spendereigenschaften ist.

Eine Zeitkinetik machte den Ablauf der PWM-induzierten Ig-Produktion in der Kultur deutlich. Die starke Erhöhung der Ig (M, G, A)-Konzentration nach vier Tagen wies auf eine

drastische Aktivierung der B-Zelldifferenzierung hin. Das Lysat der Ausgangszellsuspension enthielt Ig-Mengen, die weit unter den gemessenen Konzentrationen in den Überständen lagen. Die hohe Freisetzungsrates ließ sich nur auf eine de novo Synthese zurückführen. Sehr typisch für den Verlauf der Ig-Freisetzung war die verzögerte Anlaufphase in der Immunglobulinproduktion in den ersten vier Kulturtagen. Sie erklärt sich aus der komplexen Aktivierungskaskade in der B-Zelldifferenzierung. Die PWM-induzierte Aktivierung von T-Helferzellen ist die Voraussetzung zur Bildung von Ig-sezierenden Plasmazellen. Bei geeigneten PWM-Konzentrationen werden selektiv die Helferzellen aktiviert. Suppressorzellen werden dagegen nicht aktiviert. Ihre Funktion tritt nicht in Erscheinung, so daß die Helferzellen unbehindert agieren können.

4.2.1. Optimale PWM-Konzentrationen

PWM-Konzentrationen, die über dem Optimum liegen, fördern anscheinend die Entwicklung von Suppressorzellen. Die Ausbildung von Ig-produzierenden Plasmazellen kann in diesen Fällen unterbleiben. Es zeigte sich, daß die Reaktion unterschiedlicher Spender-PBL auf den PWM-Stimulus individuell verschieden war. Dieser Effekt äußerte sich unter anderem in der individuell optimalen PWM-Konzentration, die mit Hilfe von Verdünnungsreihen des Lektins ermittelt werden konnten. Die unterschiedlichen PWM-Optima konnten besonders deutlich in den Kulturen der sechs allergischen Spender demonstriert werden. Die Schlußfolgerung aus diesen Versuchen war:

1. Die optimale PWM-Konzentration ist schwer einzugrenzen und vorherzusagen.
2. Um eine positive Stimulierung der Ig-Produktion zu erreichen, empfahl es sich, den Kulturen mehrere PWM-Konzentrationen anzubieten. Im Bereich von 0,16 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ war in den meisten Fällen eine positive Stimulierung zu erwarten.

Zahlreiche Autoren setzen in ihren Arbeiten meist konstante PWM-Konzentrationen in der Kultur ein. Die Angaben über die verwendeten PWM-Konzentrationen gehen jedoch weit auseinander. Es werden Konzentrationen zwischen 1 µg/ml (Härfast et al., 1981) und 100 µg/ml (Fleisher et al., 1982) für vergleichbare Kulturen angegeben. In vielen Veröffentlichungen erfolgt keine Konzentrationsangabe, stattdessen wird auf eine PWM-Stammlösung der Firma Gibco Bezug genommen. In einer der ersten Arbeiten über die PWM-Stimulation von PBL erwies sich die PWM-Konzentration von 0,05 µg/ml bei einer Zelldichte von $0,6 \times 10^6$ /ml als optimal (Chessin, 1966). Diese Angabe stimmt in der Größenordnung mit den vorliegenden Ergebnissen überein.

Die unterschiedlichen Angaben über die optimalen PWM-Konzentrationen mögen auf die verschiedenen Präparationen der Hersteller zurückzuführen sein. Die variablen PWM-Optima für die Stimulation der Ig-Produktion, die in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden konnten, sind dagegen in den individuellen Unterschieden der Spenderkulturen begründet. Für die Demonstration der PWM-stimulierbaren Ig-Produktion war es aus diesem Grunde notwendig, bei jedem Kulturansatz mehrere PWM-Konzentrationen anzubieten. Viele vergebliche Versuche in der Literatur, die Ig-Produktion zu stimulieren (Bismark et al., 1984), könnten durch individuell ungeeignete PWM-Konzentrationen erklärt werden.

4.2.2. Einfluß der Zelldichte

Ein sehr wichtiger Parameter für die Stimulation der Ig-Produktion durch PWM war die Zelldichte. Die Konzentration der Zellen konnte die Stimulation entscheidend beeinflussen. Hohe Zelldichten ($1 - 2 \times 10^6$ /ml) supprimierten die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion. Die produzierten Ig-Mengen lagen bei der Anwesenheit von PWM unter der spontan freigesetzten Menge. Es konnte ausgeschlossen werden, daß zu wenig PWM angeboten wurde, da bis zu 20 µg PWM/ml in Ver-

dünnungsreihen ausgetestet wurden. Bei hohen Zelldichten scheint die Funktion der Helferzellen behindert zu sein. Wahrscheinlich ist unter diesen Bedingungen keine selektive Aktivierung der Helferzellen möglich. Die Wirkung aktivierter Suppressorzellen kann in diesen Kulturen die Stimulation der B-Zelldifferenzierung blockieren.

Da die Suppression der spontanen Immunglobulinproduktion von der Anwesenheit des PWM abhing, war zu vermuten, daß hier durch das Lektin eine Aktivierung von Suppressorzellen induziert wurde. Der Einsatz unterschiedlicher Zelldichten in zahlreichen PWM-Kulturen machte deutlich, daß es individuelle Unterschiede in der Reaktion gab. Die kritische Zelldichte, an der keine Suppression mehr beobachtet werden konnte, lag unterschiedlich hoch. Es ist zu vermuten, daß die spender-spezifischen Eigenschaften der Zellen für diese Effekte verantwortlich sind. Für das Überwiegen der Suppression bei hohen Zelldichten spielt der enge Zellkontakt möglicherweise eine entscheidende Rolle. Das würde voraussetzen, daß die Suppression durch sehr kurzlebige und nicht weitreichende Mediatoren vermittelt wird. Bei einem engen Zellkontakt zu Helferzellen könnte die Aktivität der Suppression eher zum Tragen kommen. Im Gegensatz dazu müßten die Mediatoren der B-Zellhilfe langlebiger und weitreichender sein. Bei herabgesetzten Zelldichten macht sich der Suppressionseffekt nicht mehr bemerkbar. Die Resultate belegen deutlich, daß die Induktion der Ig-Produktion durch den PWM-Stimulus ein dynamischer Prozeß ist, der sehr empfindlich auf Variationen der Kulturbedingungen, hier die Zelldichte, reagieren kann. Die Schwierigkeit liegt darin, daß zusätzlich spenderspezifische Eigenschaften, die in der humanen Immunbiologie schwer auszuschalten sind, entscheidende Einflüsse auf die kritischen Zelldichten haben können.

4.2.3. Schlußfolgerung

Die experimentellen Bedingungen in der PWM-stimulierten Lymphozytenkultur (Zelldichte, PWM-Konzentration) entscheiden über den Ablauf der B-Zelldifferenzierung. Sowohl die Potenzierung als auch die Suppression der B-Zelldifferenzierung können durch die Variation der Kulturparameter induziert werden. Sie bestimmen darüber, welche der möglichen Reaktionen überwiegt und die Immunglobulinproduktion reguliert. Die spenderspezifischen Anforderungen an die Kulturbedingungen variieren. In der humanen Immunbiologie sind nicht wie im Tiersystem einheitliche Spenderkollektive einzusetzen. Die Konsequenz daraus ist, daß Stimulationen der Immunglobulinproduktion nur dann erfolgreich beobachtet werden können, wenn die Lymphozytenkulturen in einer Vielzahl verschiedener Ansätze mit variierten Parametern durchgeführt werden. Experimentelle Ansätze, die keine Variation der Kulturbedingungen beinhalten, können unter gewissen Umständen den individuellen Anforderungen der Spenderlymphozyten nicht gerecht werden. Es bleibt jedoch offen, inwieweit die in-vivo-Situation der Spender einen Einfluß auf die optimalen Kulturbedingungen haben. Da die hier präsentierten Experimente mit gesunden Normalpersonen durchgeführt wurden, erscheint es sehr schwierig, Rückschlüsse auf die immunologische Konstitution der Spender zu ziehen.

4.3. Suppressionsmechanismen in der PWM-induzierten Ig-Produktion

4.3.1. Die PWM-vermittelte Suppression

Wie im vorangegangenen Abschnitt ausgeführt, kann PWM bei geeigneten Bedingungen die Immunglobulinproduktion von PBL-Kulturen stimulieren. Das Lektin ist unter gewissen Voraussetzungen aber auch in der Lage, eine Suppression zu induzieren. Die Resultate haben in dieser Arbeit gezeigt, daß hohe PWM-

Konzentrationen und hohe Zelldichten eine Suppression ermöglichen. In einer Veröffentlichung von Tsokos et al. (1981) wurde die Entstehung von aktiven Suppressorzellen in der PWM-aktivierten Kultur verfolgt. Sie entwickelten sich erst sechs Tage nach Kulturbeginn und konnten die Immunglobulinproduktion von frischen PBL-Kulturen inhibieren. Das Lektin ConA dagegen leitete die Entwicklung der Suppressorzellen sofort ein. Schon nach zwei Tagen waren in der ConA-aktivierten Kultur effektive Suppressorzellen nachzuweisen. Aus diesen Experimenten schlossen die Autoren, daß die Induktion der Suppression durch PWM im Gegensatz zu ConA ein indirekter Vorgang ist, der erst spät in der Kultur zur Wirkung kommt.

Wegen dieser Überlegungen sollte das Entfernen des PWM nach einer Voraktivierung von zwei bis drei Tagen die Entstehung der Suppressorzellen verhindern. In den hier vorgelegten Experimenten konnte sehr deutlich demonstriert werden, daß PWM in der späten Kulturphase (ab Tag 2) einen supprimierenden Effekt ausübt. Wenn die Kulturen nach zwei Tagen vom PWM befreit wurden, zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Ig-Produktion. Die Gegenwart von PWM hatte in diesen voraktivierten Kulturen eine inhibierende Wirkung. Dieses Ergebnis stand im Einklang mit den oben zitierten Vorstellungen über die Entwicklung der Suppressorzellen in der PWM-haltigen Lymphozytenkultur. PWM kann während der ersten zwei Tage keine Suppression induzieren.

Die Resultate unterstützen die Hypothese, daß die Suppression im PWM-System ein verzögerter Prozeß ist, der im Normalfall die Aktivierung der B-Zelldifferenzierung zuläßt.

Von mehreren Autoren wurde die dynamische Entwicklung der Helfer- und Suppressorzellen in der PWM-aktivierten PBL-Kultur analysiert. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen T4 (Helfer/Inducer) und T8 (Suppressor/CTL) positiven T-Zellen konnte die Proliferation der verschiedenen Subpopulationen verfolgt werden. Jones (1983) stellte fest, daß T8+

Suppressorzellen sich in ihrer Anzahl vom vierten bis zum siebten Tag in der PWM-aktivierten Kultur verdoppeln. T4+ Helferzellen vermehren sich im gleichen Zeitraum jedoch nicht. Bei der Entfernung von T8+ Suppressorzellen aus der Kultur erhöhte sich jedoch die Anzahl der T4+ Helferzellen um den Faktor 6. Auch die B-Zellen konnten sich in Abwesenheit von T8+ Suppressorzellen um den Faktor 10 vermehren. In Gegenwart von Suppressorzellen war dagegen nur eine Verdoppelung der B-Zellen zu bemerken. Im Zeitraum zwischen dem vierten und siebten Tag findet also eine Proliferation der T8+ Suppressorzellen statt, welche ihrerseits die Vermehrung von T4+ Helferzellen und B-Zellen unterdrücken.

Puck et al. (1982) fanden eine Vermehrung von Helferzellen, wenn sie durch kombinierte Bromdeoxyuridin- und Lichtbehandlung proliferierende Suppressorzellen am Tag 8 abtöteten. Auch dieser Befund belegt, daß die Entwicklung der Helferzellen in der Kultur durch Suppressorzellen inhibierend reguliert wird. Zusammenfassend ergab sich daraus:

1. daß die Proliferation der T8+ Suppressorzellen in einem späten Abschnitt der Kultur stattfindet,
2. daß diese aktivierten Suppressorzellen die Vermehrung von T4+ Helferzellen blockieren.

Die verzögerte Aktivierung von Suppressorzellen durch PWM ist ein Vorgang, der eine Kaskade von mehreren Schritten beinhaltet. Eine direkte Aktivierung der Suppressorzellen ist nur durch Lektine wie ConA oder PHA möglich. PWM dagegen wirkt indirekt. Folgende Vorstellungen existieren in der Literatur zu diesem Problem:

Die T4+ T-Zellen sind funktionell in zwei Subpopulationen einzuteilen. Die eine Gruppe (Helferzellen) ist ausschließlich für die Hilfe der B-Zelldifferenzierung zuständig, die andere Population ("Inducer"-Zellen) ist für die Induktion von Suppressorzellen und "Cytotoxic T-Lymphocytes" (CTL) zu-

ständig. Hinsichtlich ihrer Funktion werden sie meist als Suppressor-Inducer (SI)-Zellen bzw. als CTL-Inducer-Zellen bezeichnet. Differenzierende Oberflächenmarker sind für diese Subpopulationen mittlerweile in der Literatur beschrieben (s. Tab. 13).

Es konnte gezeigt werden, daß Inducer-Zellen für die Aktivierung von Suppressorzellen notwendig sind. Im PWM-System geht die Aktivierung der SI-Zellen der von Suppressorzellen voraus. Eine selektive Depletion von SI-Zellen hat zur Folge, daß Suppressorzellen ihre Wirkung nicht entwickeln können (Yachie, 1982; Puck, 1984). Im Zusammenhang mit den zitierten Erkenntnissen aus der Literatur lassen die hier vorgelegten Experimente folgende Schlüsse zu:

1. Die Aktivierung der Suppression ist in den ersten zwei Tagen nicht abgeschlossen.
2. Die Funktion der SI-Zellen bedarf einer länger anhaltenden Gegenwart von PWM.
3. Die Induktion der effektiven (T8+) Suppressorzellen benötigt vermutlich zwei Signale: PWM und aktivierte SI-Zellen.

Ein Modell für diesen komplexen Regulationsvorgang ist in der Abb. 41 dargestellt.

4.3.2. Die Wirkung von ConA-Sepharose-induzierten Suppressorfaktoren in der PWM-Kultur

Die Reaktionen in einer PWM-aktivierten PBL-Kultur sorgen bei optimalen Bedingungen für eine Aktivierung von T-Helferzellen. Dieser Prozeß unterstützt die B-Zelldifferenzierung und ermöglicht die Ig-Produktion der Plasmazellen. Eine Aktivierung der T-Suppressorzellen findet in den ersten zwei Tagen noch nicht statt. Wie bereits erwähnt, stimulieren jedoch die Lektine ConA und PHA schon zu Beginn einer Lymphozytenkultur die Suppressorzellen. ConA wurde in vielen Arbeiten

für die Aktivierung einer Suppression eingesetzt. Sowohl ganze Zellen (Dutton, 1975) als auch lösliche Überstände (Rich und Pierce, 1974; Fleisher et al., 1981) aus ConA-aktivierten Lymphozytenkulturen erwiesen sich in der PWM-stimulierten B-Zelldifferenzierung als inhibierend.

Der Einsatz von intakten Zellen in humanen Kultursystemen hat den experimentellen Nachteil, daß mit syngeneten Zellen gearbeitet werden muß, um allogene Effekte zu vermeiden. Bei einer Kombination von Lymphozyten verschiedener Spender sind natürlich allogene Aktivierungen der T-Zellen zu erwarten, so daß unkontrollierte Effekte auftreten können. Derartige Probleme sind im Tiermodell nicht vorhanden, da hier genetisch einheitliche Zuchtstämme zur Verfügung stehen. Wegen dieser Schwierigkeit beschränkte sich die Arbeit zunächst auf die Produktion von löslichen Suppressorfaktoren. Es war zu erwarten, daß die löslichen Suppressorfaktoren dazu beitragen, die Regulation in der PWM-induzierten Ig-Produktion besser zu verstehen. Bei der Gewinnung von supprimierenden Lymphozytenüberständen wurde in dieser Arbeit mit Erfolg ConA-Sepharose als Stimulus eingesetzt. Diese Überstände waren auf einfache Weise zu gewinnen. Sie stammten einerseits aus ConA-aktivierten Kulturen, hatten aber andererseits den Vorteil, frei von löslichem ConA zu sein. Andere Autoren, die Suppressorüberstände aus ConA-aktivierten Lymphozytenkulturen gewannen, mußten entweder umständliche Kontrollen durchführen, das ConA entfernen oder den ConA-Inhibitor Methyl-Mannose bei der Austestung zusetzen. Ohne diese Maßnahmen war die Suppression schon durch das mitgeschleppte, lösliche ConA in der Testkultur zu erwarten, da das Lektin direkt die Suppressorzellen der Testkultur aktivieren konnte. Bei der Stimulation mit ConA-Sepharose blieb das Lektin dagegen an der Sepharose-Matrix, ohne seine mitogenen und aktivierenden Eigenschaften zu verlieren.

Beim Einsatz in der PWM-aktivierten Kultur konnte die suppressierende Aktivität dieser Überstände nachgewiesen werden. Die Suppression betraf spezifisch nur die Ig (M, G, A)-Produktion, eine Inhibition der PWM-induzierten Proliferation wurde nicht beobachtet. Stattdessen war eine geringfügige Stimulation des Thymidineinbaus zu beobachten.

Toxische Eigenschaften zeigte der Überstand nicht. Bei der Kultivierung der U-266-Nyelomazelllinie war keine Einschränkung der IgE-Produktion zu beobachten. Spontane Immunglobulinproduktionen von Lymphozytenkulturen in der Abwesenheit von PWM wurden ebenfalls nicht inhibiert. Zusammengekommen kann die Suppression durch den Überstand CASS nicht mit einer toxischen, unspezifischen Reaktionsweise erklärt werden. Bei der Messung der zeitabhängigen Ig (M, G, A)-Produktion in PWM-stimulierten PBL-Kulturen reduzierte der Überstand die Ig-Freisetzung. Die Ig-Konzentrationen lagen jedoch immer noch über den Werten der spontan produzierenden Kultur.

In der Abwesenheit von PWM wirkte CASS nicht mehr supprimierend. CASS hatte im Gegenteil eine potenzierende Aktivität hinsichtlich der Ig-Produktion. Die Zeitkinetik macht den dynamischen Prozeß der Stimulation durch CASS deutlich. Die Steigung der Produktionskurve wurde durch den Überstand steiler und ließ daher den Schluß zu, daß es sich um eine de novo Produktion handelte. Wenn CASS Immunglobuline im Überstand mitgeschleppt hätte, wäre diese Menge auch am Anfang der Kultur meßbar gewesen. Die gegensätzlichen Wirkungen des gleichen Überstandes waren ein Hinweis auf die Vielfalt der verschiedenen Faktoren, die sich im Überstand der mit ConA-Sepharose aktivierten Kultur befanden. Die supprimierende Aktivität von CASS trat nur in PWM-stimulierten Kulturen auf. Für diesen Effekt gab es zwei mögliche Erklärungen:

1. Die Suppression konnte ihre Wirkung nur bei einer stimulierten B-Zelldifferenzierung entfalten.

2. Die supprimierende Wirkung des Überstandes war auf das PWM angewiesen.

Diese Hypothesen konnten mit der PWM-voraktivierten Kultur überprüft werden. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, konnten die Lymphozytenkulturen nach zwei Tagen vom PWM befreit werden, ohne daß die Immunglobulinproduktion eingeschränkt wurde. Diese PWM-freien Kulturen enthielten also B-Zellen, die ausreichend stimuliert waren. CASS konnte hier jedoch seine supprimierende Aktivität nicht entfalten. Erst der Zusatz von PWM stellte die supprimierende Wirkung wieder her. Sie war nicht von einer hohen Ig-Produktion abhängig und eindeutig auf die Gegenwart des PWM angewiesen. Zusammenfassend ließ sich folgendes feststellen:

Die Überstände von ConA-Sepharose-aktivierten Lymphozyten beinhalten eine Reihe von biologischen Aktivitäten. Darunter sind Faktoren, die synergistisch mit einem Aktivierungsanreiz durch PWM eine Suppression der B-Zelldifferenzierung in den PBL-Kulturen fördern.

4.3.3. Mechanismen für die mögliche Wirkung von CASS in der Suppressionskaskade

Im folgenden Abschnitt soll versucht werden, die supprimierenden Effekte von CASS mit den Vorstellungen der Literatur über die Suppression in Einklang zu bringen. Die Abb. 41 stellt die Suppressionskaskade modellhaft dar. Kurz zusammengefaßt existieren folgende Vorstellungen:

1. T8+ Suppressorzellen inhibieren die Hilfe der T4+ Helferzellen.
2. T8+ Suppressorzellen kommen in zwei verschiedenen Stadien vor; die Suppressor-Vorläufer (SV)-Zelle geht nach einer Aktivierung in die Suppressor-Effektor (SE)-Zelle über.
3. Die Aktivierung der Suppressor-Vorläufer-Zellen ist von der Mitwirkung der T4+ Suppressor-Inducer (SI)-Zelle abhängig.

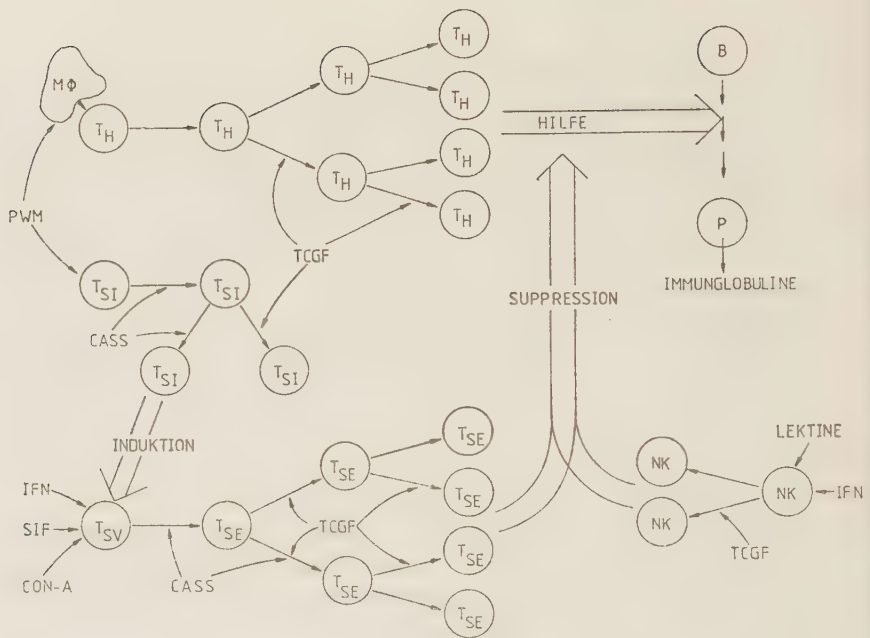


Abb. 41: Modell für T-Zell-vermittelte Suppression der B-Zelldifferenzierung; der mögliche Einfluß von CASS

- MΦ :** Makrophagen/Monozyten
TH : T-Helferzellen
TSI: T-Suppressor-Inducer-Zelle
TSV: T-Suppressor-Vorläufer-Zelle
TSE: T-Suppressor-Effektor-Zelle
NK : "Natural-Killer"-Zelle
P : Plasmazelle

Von den folgenden Resultaten der CASS-vermittelten Suppression mußte zunächst ausgegangen werden:

1. Der ConA-Sepharose induzierte PBL-Überstand (CASS) zeigte in der PWM-aktivierten PBL-Kultur eine Suppression der Immunglobulinproduktion.
2. Die Suppression war von der Gegenwart des PWM abhängig. Ohne das Lektin hatte der Überstand keine supprimierende Wirkung auf die Immunglobulinproduktion.
3. CASS hatte keine supprimierende Wirkung in einer isolierten B-Zellkultur.

Diese Befunde sprechen für einen indirekten Mechanismus der Suppression, an dem die regulatorischen T-Zellen beteiligt sind. Im Zusammenspiel mit PWM scheint CASS die Entwicklung von Suppressorzellen zu fördern.

4.3.3.1. Die Beteiligung von TCGF an der Suppressionskaskade

Für die Proliferation von aktivierten T-Zellen ist die Anwesenheit des Wachstumsfaktors TCGF ("T-Cell Growth Factor") eine Grundvoraussetzung. Es ist deshalb berechtigt, nach der Funktion von TCGF im Ablauf der Suppressionskaskade zu fragen. Die Messung von TCGF in dem Überstand CASS hatte zwar geringe, aber doch deutliche Mengen einer TCGF-Aktivität ergeben. Die Zugabe von CASS am Anfang der PWM-Kultur könnte der normalen TCGF-Produktion in der Testkultur vorgreifen und die Dynamik der T-Zellproliferation zugunsten der Suppressorzellen beeinflussen. Diese Hypothese ließe sich durch folgendes Experiment klären: TCGF muß in einer definierten Form der PWM-stimulierten Kultur zugesetzt werden. Lymphokult ist in diesem Fall als TCGF-Quelle ungeeignet, da dieses Material

1. humanes Serum,
2. PHA,
3. undefinierte Lymphokine

enthält. Erst seit kurzer Zeit sind TCGF-Präparationen aus rekombinanten Bakterien erhältlich, die eine saubere Analyse

erlauben (Taniguchi, 1983; Rosenberg, 1984). In einem isolierten T-Zellsystem müßte die Wirkung von TCGF unter folgender Fragestellung untersucht werden:

1. Proliferieren aktivierte Suppressorzellen in der Anwesenheit von TCGF?
2. Wird die Aktivierung der Suppressor-Vorläufer-Zellen zu Suppressor-Effektor-Zellen durch TCGF ermöglicht?
3. Gibt es spezifische Wachstumsfaktoren für die Entwicklung und Aktivierung von Suppressorzellen, die sich von den bekannten Lymphokinen unterscheiden?

Zur Diskussion dieser Fragen sollen die folgenden Hinweise aus der Literatur gegeben werden:

Puck und Rich (1984) demonstrierten, daß TCGF von proliferierenden Suppressorzellen absorbiert wird. Diese Zellen zeigten weiterhin die Ausbildung von TCGF-Rezeptoren, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen das "Tac"-Antigen in der Immunfluoreszenz erkannt wurden (Leonhard et al., 1982). T4+ Helferzellen konnten dagegen nur in der Abwesenheit von T8+ Suppressorzellen mit TCGF proliferieren. Die Autoren schlossen daraus, daß zwischen den beiden Zelltypen eine Konkurrenz um TCGF existiert. Durch eine höhere Affinität von T8+ Zellen zu TCGF könnte den T4+ Zellen der Wachstumsfaktor vorenthalten werden, so daß diese ihre Hilfe für die B-Zelldifferenzierung nicht ausführen können.

Im Einklang mit dieser These stand der Befund von Palacios und Möller (1981). Die Autoren zeigten, daß die Zugabe von TCGF eine ConA-induzierte Suppressorzellfunktion aufhob. Anscheinend wurde durch die Zugabe von einem Überschuß an TCGF die gleichzeitige Proliferation von T4+ und T8+ Zellen ermöglicht, so daß die B-Zelldifferenzierung ungehindert induziert werden konnte. TCGF stellt sich in diesem Zusammenhang als limitierender Faktor in der B-Zellhilfe dar. Diese Erkenntnis steht jedoch im Widerspruch zu der eingangs aufge-

stellten Hypothese, daß TCGF in der PWM-aktivierten Kultur eine Suppression fördert. Wenn TCGF einen regulatorischen Einfluß auf die Helfer- und Suppressorzellen haben soll, müßte die Expression des TCGF-Rezeptors bzw. Tac-Antigens eine entscheidende Rolle spielen. Die unterschiedliche Dichte der Rezeptoren und die zeitliche Abfolge der Expression auf den T4+ oder T8+ Zellen könnten die Ausbildung der Hilfe oder Suppression für die B-Zelldifferenzierung bestimmen. Für die Expression des TCGF-Rezeptors sind Aktivierungsvorgänge verantwortlich, die in der PWM-aktivierten Kultur noch relativ unklar sind.

Gegen die soeben erwähnte "Konkurrenz-Hypothese" sprechen die Befunde anderer Autoren. Es wurde nachgewiesen, daß die Suppression, aber nicht die Hilfe der T-Zellen bei der B-Zelldifferenzierung sensibel gegen Gammastrahlung ist (Siegal und Siegal, 1977). Da die Bestrahlung die Proliferation hemmt, erscheint es fragwürdig, ob die Notwendigkeit einer TCGF-abhängigen Vermehrung der T4+ Helferzellen für die B-Zelldifferenzierung besteht. Mitomycin C behandelte Leu3+ (T4+) Helferzellen waren jedenfalls in der Lage, die PWM-induzierte Ig-Produktion zu unterstützen (Clement, 1983). Nur bei einer geringen Anzahl von T4+ Helferzellen war eine Empfindlichkeit gegenüber der proliferationshemmenden Bestrahlung zu beobachten.

Die oben erwähnte "Konkurrenz-Hypothese" kann deshalb nicht vollständig zurückgewiesen werden. Wahrscheinlich sind die unterschiedlichen Zusammensetzungen einer PBL-Kultur darüber entscheidend, ob TCGF für die T4+ Helferzellen ein limitierender Faktor ist oder nicht. Bei einer geringen Anzahl von T4+ Helferzellen könnte das erstere der Fall sein. In einer derartigen Kultur wäre erst eine Proliferation der Helferzellen notwendig, um die B-Zelldifferenzierung einzuleiten. Dagegen ist bei einer ausreichenden Menge von T4+ Zellen keine TCGF-verbrauchende Proliferation notwendig. TCGF ist

dann kein limitierender Faktor. Zusammengekommen spricht vieles dafür, daß die Konkurrenz-Hypothese nur relativ unspezifische Effekte beschreibt. In jedem Fall hat TCGF keine spezifisch supprimierende Aktivität, obwohl der Faktor für die Vermehrung der Suppressorzellen notwendig ist. Für die Analyse der supprimierenden CASS-Aktivität bedeutet dies, daß das enthaltene TCGF anscheinend nicht für die Suppression verantwortlich ist.

Eine Klärung dieses Problems könnte durch spezifische Depletion des TCGF aus dem Überstand CASS versucht werden. Dafür stehen zwei mögliche Wege zur Verfügung:

1. Absorption durch Inkubation mit TCGF-abhängigen T-Zelllinien,
2. Anwendung eines spezifischen Antikörpers.

4.3.3.2. Aktivierung von Suppressor-Inducer-Zellen

Wie bereits erwähnt, müssen T8+ Suppressorzellen vom inaktiven Vorläuferstatus (SV-Zellen) in einen aktiven Effektorstatus (SI-Zellen) überführt werden. Diese Aktivierung wird von der Funktion anderer Zelltypen überwacht, den T4+ Suppressor-Inducer-(SI)-Zellen. Diese Zellen haben selber keine effektive Suppressionswirkung. Sie sind lediglich an der Aktivierung der Suppressorzellen beteiligt. (Eine Übersicht über diese verschiedenen Zelltypen ist bei Ballieux, 1983, Immunol. Rev. 74: 5 zu finden. Eine Liste der unterschiedlichen Zellmarker ist in der Tab. 13 angegeben.)

Auch die T4+ SI-Zellen müssen ihrerseits aktiviert werden. Nach einer Inkubation mit PWM exprimieren die SI-Zellen das Ia-Antigen (Yachie, 1982). Die Depletion von Ia+ SI-Zellen reduziert die Suppressor-Inducer-Funktion der T4+ Zellen. Aktivierte SI-Zellen sind empfindlich für eine Strahlenbehandlung (Thomas, 1981). Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß auch diese Zellen proliferieren müssen, um ihre Aktivität

Tab. : Oberflächenmarker der regulatorischen T-Zellen

	T3	T4	T8	Leu2	Leu3	Leu8	R(Fc γ)	R(Fc μ)	JRA	TQ1	AR
Helper	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	?
Suppressor-Inducer	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	?
Suppressor-Vorläufer	+	-	+	+	-	?	-	-	?	?	+
Suppressor-Effektor	+	-	+	+	-	?	+	-	?	?	-

T3, T4, T8, Leu2, Leu3, Leu8, TQ1 sind Oberflächenmarker, die mit monoklonalen Antikörpern beschrieben werden.

R(Fc γ) und R(Fc μ) sind Rezeptoren für Fc γ und Fc μ .

JRA ist ein Marker, der durch Autoantikörper von Patienten mit der Juvenilen Rheumatoiden Arthritis erkannt wird.

AR kennzeichnet T-Zellen, die bei 0° C mit autologen Erythrozyten rosettieren.

Literatur: Ballieux, 1983
 Reinherz, 1982
 Morimoto, 1983
 Moretta, 1977
 Gatenby, 1982

zu entfalten. Die Entwicklung ihrer Aktivität in der PWM-Kultur scheint jedenfalls ein langwieriger Prozeß zu sein. Yachie (1982) und Miyawaki (1981) mußten T4+ Zellen acht Tage lang mit PWM inkubieren, um eine ausreichende Expression der Ia-Antigene zu demonstrieren. In den vorgelegten Experimenten war eine zweitägige Inkubation mit PWM nicht ausreichend, um die Suppression zu aktivieren. Erst danach konnte PWM mit oder ohne CASS Suppression einleiten. Da durch die Anwesenheit von CASS die PWM-induzierte Suppression beschleunigt wurde, könnte die Wirkung von CASS in einer Aktivität bestehen, die die Entwicklung der SI-Zellen fördert. In der Aktivierung der T4+ SI-Zellen und der T4+ Helferzellen scheinen prinzipielle Unterschiede zu herrschen. Heijnen et al. (1981) konnten zeigen, daß die Aktivierung der Helferzellen von der Anwesenheit der Makrophagen (Monozyten) abhängig ist. Dies gilt jedoch nicht für die SI-Zellen.

4.3.3.3. Aktivierung von Suppressor-Vorläufer-Zellen

Die Induktion von aktiven Suppressorzellen (SE-Zellen) kann nach Kasakura et al. (1983) durch einen löslichen Faktor ermöglicht werden. Dieser "Suppressor Inducer Factor" (SIF) wurde in "Mixed Lymphocyte Culture"-(MCL)-Überständen nachgewiesen und war nicht identisch mit TCGF. Allerdings war dieser Faktor auf die gleichzeitige Anwesenheit von SI-Zellen angewiesen. Aus diesem Grund kann die beschriebene SIF-Wirkung nicht als induzierende, sondern nur als eine unterstützende Aktivität bei der Induktion von aktiven Suppressorzellen interpretiert werden.

Im Vergleich unterscheidet sich SIF von CASS hinsichtlich der Testbedingungen. Die supprimierende Wirkung von CASS ist auf einen zusätzlichen Aktivierungsstimulus, das PWM, angewiesen; SIF dagegen benötigt die Gegenwart der T4+ SI-Zellen. In ihrer Wirkung kommen sich ihre Aktivitäten sehr nahe, auch wenn sie auf verschiedene Weise gewonnen sind. Der SIF

enthaltende MLC-Überstand ist ebenso wie CASS frei von löslichen Lektinen. Im Gegensatz zu CASS entstammt er einer allogenen- und nicht einer ConA-aktivierten Kultur.

Das Lektin ConA ist in der Lage, Suppressorzellen direkt zu aktivieren (Peavy, 1974; Shou, 1976; Haynes, 1977). Die ConA-induzierte Aktivierung ist nicht auf die Anwesenheit von Suppressor-Inducer-Zellen angewiesen. Palacios (1982) konnte nachweisen, daß ConA sich direkt an die T-Zelle bindet und TCGF-Rezeptoren zur Expression bringt. Diese direkte Aktivierung ist auch bei T8+ Suppressorzellen möglich und benötigt im Gegensatz zur PWM-induzierten Aktivierung von Suppressorzellen keine T4+ Suppressor-Inducer-Zellen. Die schnelle Aktivierung der Suppression durch die Zugabe von ConA in PWM-stimulierte PBL-Kulturen ist damit zu erklären.

Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit für SV-Zellen wird dem Interferon (IFN) zugeschrieben (Schnaper, 1983). Eine ein- bis zweitägige Inkubation von T8+ Zellen mit Leukozyten-Interferon (IFN α) konnte die T8+ Zellen in effektive Suppressorzellen verwandeln. Bei der Aktivierung war die Anwesenheit von T4+ SI-Zellen nicht notwendig. Die Suppression betraf die Funktion der T4+ Helferzellen und wirkte nicht direkt auf die B-Zelldifferenzierung. Das IFN-Präparat war gentechnisch hergestellt und war frei von anderen, aktivierenden Substanzen, so daß IFN in der Lage war, ohne zusätzlichen Stimulus Suppressorzellen direkt zu aktivieren. Interferon induzierte nicht nur Suppressorzellen für die B-Zelldifferenzierung, sondern auch für die MLC- und Lektin-induzierte T-Zell-Proliferation. Letztere Eigenschaft war bei den CASS-Faktoren nicht zu beobachten. Weiterhin unterscheiden sich die CASS-Faktoren dahingehend vom Leukozyten-Interferon, daß ein zusätzlicher Stimulus (PWM) für die Aktivierung der Suppressorzellen notwendig ist. In einer anderen Arbeit (Choi, 1981) wird im Gegensatz zu der oben erwähnten (Schnaper, 1983) ein anderer Suppressionsmechanismus des IFN

postuliert. Nach Auffassung der Autoren konnte Interferon direkt die Helferzellen inhibieren und hatte keinen Einfluß auf die Wirkung der Suppressorzellen.

4.3.3.4. NK-Zellen als Suppressorzellen

Interferon als Aktivator von Suppressorzellen ist ein Hinweis auf die mögliche Beteiligung von Natural Killer Zellen (NK-Zellen) bei der Suppression der B-Zelldifferenzierung. Diese NK-Zellen sind große, granuläre Lymphozyten, die eine spontane Zytotoxizität gegen bestimmte Tumorzelllinien aufweisen, ohne daß eine Immunisierung vorangegangen ist. In ihrer Wirkung ähneln sie den zytotoxischen T-Zellen. Da sie eine geringe Anzahl von Rezeptoren für Schaferythrozyten haben, sind sie als T-Zell-ähnliche Lymphozyten anzusehen. T3 und T8 Antigene sind in geringer Anzahl auf NK-Zellen zu finden. In Kultur können sie mit Hilfe von TCGF vermehrt und kloniert werden (Nabel, 1982). Die Beziehung zum Interferon scheint eine doppelte zu sein. Auf der einen Seite kann Leukozyteninterferon die Aktivität der NK-Zellen steigern (Einhorn, 1978), auf der anderen Seite wird es auch von NK-Zellen produziert (Arai, 1983).

Arai et al. (1983) berichten, daß NK-Zellen die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion inhibieren können. Die supprimierende Aktivität ist unabhängig von T8+ Zellen. Die NK-Zellen haben nach Auffassung der Autoren aber keine direkte Wirkung auf die isolierte B-Zelldifferenzierung. Vielmehr inhibieren sie die Aktivität der T4+ Helferzellen. In ihrer Wirkung ähneln sie damit den aktiven T8+ Suppressorzellen. Der experimentelle Ansatz in der zitierten Veröffentlichung kann nicht ausschließen, daß eine zusätzliche Aktivierung der NK-Zellen durch PWM erforderlich ist. Die Killer Aktivität von murinen NK-Zellen kann jedenfalls durch Inkubation mit Lektinen erhöht werden (Brunda, 1982).

Zusammengenommen machen die Ergebnisse deutlich, daß NK-Zellen eine den T8+Zellen sehr ähnliche Suppressorfunktion bei der B-Zelldifferenzierung ausüben. Da Interferon die Aktivität der NK-Zellen allgemein erhöhen kann, könnten die im vorangegangenen Abschnitt zitierten Ergebnisse von Schnaper (1983) neu interpretiert werden. Es wäre denkbar, daß durch die Vorinkubation mit IFN anstelle von T-Suppressorzellen NK-Zellen aktiviert wurden. Wegen der Ähnlichkeit dieser Zelltypen ist durchaus eine Verwechslung möglich. Eine eindeutige Unterscheidung wäre durch den NK-Zellmarker HNK-1 (Abo, 1981) gegeben.

Während Arai et al. (1983) die supprimierende Aktivität der NK-Zellen auf die Inhibition von T4+ Helferzellen beziehen, sprechen andere Befunde für abweichende Mechanismen. Mit Hilfe einer klonierten, TCGF-abhängigen NK-Zelllinie konnte im Maussystem gezeigt werden, daß eine direkte Inhibition von differenzierenden B-Zellen möglich ist (Nabel, 1982). Eine leichte Inhibition von Helferzellen durch die erwähnte NK-Zelllinie ist dabei allerdings auch demonstriert worden.

Eine NK-Zellen-unterstützende Wirkung durch CASS-Faktoren ist nicht auszuschließen. Eine derartige Wirkung würde aber voraussetzen, daß NK-Zellen erst durch die Anwesenheit von PWM sensibel für die unterstützenden Faktoren werden und ihre supprimierende Aktivität entfalten.

4.4. Die Immunglobulin E Produktion in vitro

Die vorliegende Arbeit hatte sich die Aufgabe gestellt, eine Induktion der IgE-Antwort in vitro darzustellen. Für die Aufklärung der Regulationsmechanismen wäre eine experimentell aktivierbare Differenzierung der IgE-produzierenden B-Zellen von großer Bedeutung. Modelle für die Entwicklung der humanen IgE-Antwort waren zu Beginn der achtziger Jahre in der Literatur nicht allgemein anerkannt. Das betraf besonders die Vorstellung einiger Autoren, daß die IgE-Produktion in der

Kultur durch PWM stimulierbar ist. Einige Veröffentlichungen berichten von einer Stimulierbarkeit (Saxon, 1981; Zuraw, 1981), andere Berichte können diese Befunde nicht bestätigen (Turner, 1981; Hemady, 1983; Spiegelberg, 1983).

In der vorliegenden Arbeit war bei den untersuchten Spenderlymphozyten die Tendenz zu erkennen, in der Kultur nicht stimulierbar zu sein. Dies traf vor allen Dingen bei gesunden, nicht allergischen Personen zu. Wie bereits in einem anderen Zusammenhang erwähnt, wurde die PWM-Kultur in verschiedenen Parametern variiert:

1. PWM wurde über einen weiten Konzentrationsbereich angeboten.
2. Verschiedene Zelldichten wurden eingesetzt.
3. Die IgE-Produktion wurde bis zum Tag 11 verfolgt.
4. Allergische und gesunde Personen wurden untersucht.

Bei gesunden Personen war in über 50 verschiedenen Experimenten keine Stimulierbarkeit zu beobachten. Auch die mehrfache Variation der Kulturbedingungen ergab keinen Stimulationserfolg. In der PWM-stimulierten Kultur zeigte die IgE-Produktion keine Parallelität zur Ig (M, G, A)-Produktion.

Im Kollektiv der sechs allergischen Bäckerasthmatiker wurde bei drei Wiederholungen ($n = 6 \times 3 = 18$) nur in einem einzigen Kulturansatz eine signifikante Stimulierung gefunden. Diese Stimulierung trat nach der medikamentösen Behandlung auf. Eine Korrelation mit der Behandlung und der Allergenexposition war wegen der geringen Fallzahl nicht möglich. In parallelen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte dagegen in einigen Fällen eine Stimulation beobachtet werden (Voshaar, 1982; Hess, 1983). Zusammengekommen zeigte sich hier, daß etwa 30 % der allergischen Spender (Bäckerasthmatiker und Pollinotiker) stimulierbar waren. Hier fehlten jedoch noch Auskünfte über die Stimulierbarkeit als individuelle Eigenschaft bzw. über die Abhängigkeit vom Krankheitsstatus.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse muß festgestellt werden:

1. Die Stimulierbarkeit der IgE-Produktion durch PWM ist nur in einer geringen Anzahl von Lymphozytenkulturen zu beobachten. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Lymphozyten allergischer Spender.
2. Die Stimulierbarkeit ist nicht für bestimmte Personen vorherzusagen.
3. Für die allgemeine Untersuchung von Regulationsmechanismen der IgE-Produktion ist der schwer reproduzierbare Stimulationseffekt nur schlecht zu verwerten.

4.4.1. Das Ausbleiben der Stimulation als Funktion von Suppressorzellen

Die spontane IgE-Produktion in den Kulturen allergischer Spender war relativ gut zu verfolgen. In einer weiteren Arbeit der Arbeitsgruppe (Hess, 1983) konnte die spontane IgE-Produktion der Lymphozyten von allergischen Spendern mit der Serumkonzentration korreliert werden. Die Produktion spiegelt jedoch den Anteil der IgE-sezernierenden Plasmazellen wieder, die bereits in vivo ausdifferenziert waren. Insofern ist die spontane IgE-Produktion kein Modell für die Induktion einer IgE-Antwort. Eine Erklärung für die ausbleibende Stimulation der IgE-Produktion durch PWM ist die These, daß Suppressorzellen eine Stimulation der Vorläuferzellen verhindern. In der Maus können IgE-tragende Vorläuferzellen durch Suppressorzellen in ihrer Entwicklung inhibiert werden (Katz, 1978). Aus diesem Grund wurden im humanen System Experimente unternommen, um den Einfluß dieser Suppressorzellen zu inhibieren. Zuraw et al. (1981) hatten in diesem Zusammenhang versucht, die Wirkung der Suppressorzellen auszuschalten. Durch das Entfernen von PWM aus der PBL-Kultur nach einer zweitägigen Induktionsphase gelang es ihnen, die Stimulation der IgE-Produktion nachzuweisen. Das gleiche Protokoll war in der vorgelegten Arbeit für IgE erfolglos. Die Gründe dafür sind schwer

auszumachen. Auf der einen Seite könnte es an der Spezifität der IgE-Messung liegen (s. Abschnitt 4.1.2.), auf der anderen Seite sind die im humanen Modell schwer standardisierbaren Kulturbedingungen (verschiedene FCS-Chargen, Spenderkollektive, Medien etc.) immer eine mögliche Erklärung. Allerdings haben auch andere Autoren (Holt, 1981) vergeblich versucht, das Kulturmodell von Zuraw et al. (1981) zu etablieren. Eine endgültige Klärung dieser Differenzen steht noch aus.

Eine weitere Möglichkeit zur Ausschaltung von Suppressorzellen, die die Stimulierung zur IgE-Produktion inhibieren, ist nach Ansicht von Hovmark et al. (1981) der Einsatz des Betarezeptorenblockers Propranolol. In den Händen dieser Autoren konnte der Zusatz von Propranolol die IgE-Produktion in den Kulturen gesunder Spender erheblich steigern. In der vorgelegten Arbeit war dieser Effekt nicht zu vollziehen. Auch der zusätzliche Einsatz von PWM hatte keinen Erfolg. Propranolol zeigte allerdings modulatorische Aktivitäten hinsichtlich der PWM-stimulierten Aktivitäten wie Thymidineinbau und Ig (M, G)-Produktion.

4.4.2. Die möglichen Gründe für die Schwierigkeit, eine Stimulation der IgE-Produktion nachzuweisen

Im folgenden Abschnitt soll auf die möglichen Ursachen für das häufige Ausbleiben der stimulierbaren IgE-Produktion in der PBL-Kultur eingegangen werden. Zunächst muß auf die geringe Anzahl von IgE-produzierenden B-Zellen in der Kultur hingewiesen werden. Wenn normale Ig-Produktionsraten der IgE-produzierenden B-Zellen angenommen werden, enthalten $1,5 \times 10^6$ PBL (die Menge einer 1,5 ml Kultur in dieser Arbeit) nur 5 - 20 IgE-produzierende Zellen. Es ist durchaus möglich, daß bei einer derartig geringen Zelldichte Zellkontakte mit stimulierenden Helferzellen ausbleiben, die eventuell notwendig sind. Versuche mit bewegten PBL-Kulturen waren allerdings erfolglos. Es war nicht sicher, ob die Hilfe für die IgE-Produktion über lösliche Faktoren vermittelt werden konnte, wie bei den anderen Immunglobulinen.

In der Literatur, wie auch in den vorgelegten Daten, zeichnet sich ab, daß die Differenzierung zu Plasmazellen ein isotypenspezifischer Vorgang ist, der durch isotypenspezifische Helferfaktoren entsprechender T-Helferzellen vermittelt wird. Es kann postuliert werden, daß es auch für die Differenzierung der IgE-produzierenden Plasmazellen IgE-spezifische Helferzellen gibt, die entsprechende Helferfaktoren freisetzen. Die Frequenz und Aktivierbarkeit dieser postulierten Helferzellen in der Kultur würde möglicherweise die Differenzierung und Aktivierbarkeit der IgE-produzierenden B-Zellen bestimmen.

Lanzavecchia et al. (1983) ist es gelungen, IgE-spezifische Helferzellen in allogenen-stimulierten T-Zellkulturen anzu-züchten und zu klonieren. Diese T-Zellklone bieten eventuell die Möglichkeit, mit monoklonalen Antikörpern Antigene für isotypenspezifische Helferzellen zu definieren. Vielleicht lassen sich auf diesem Wege Rückschlüsse auf die Frequenzen von IgE-spezifischen Helferzellen machen. Es wäre wichtig zu wissen, inwieweit Zusammenhänge zwischen der Stimulierbarkeit und den Helferzellen bestehen.

Die Frequenz der IgE-Vorläuferzellen ist ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der Analyse der IgE-Produktion. Die Aktivierung dieser Vorläuferzellen ist von großer Bedeutung in der Stimulation. Die Menge der aktivierbaren IgE-Vorläuferzellen bestimmt bei optimalen Stimulierungsbedingungen das Ausmaß der IgE-Produktion. Berechnungen über die Vorläuferfrequenz der IgE-produzierenden B-Zellen sind in zwei Arbeiten durchgeführt worden. Die Analysen wurden in unterschiedlichen Aktivierungssystemen gemacht:

1. in der PWM-Stimulation (Saxon, 1981),
2. in der Stimulation mit allogenen Helferzellklonen (Lanzavecchia, 1983).

In beiden Systemen wurden die Frequenzen mit der "Limiting Dilution"-Methode ermittelt. Lanzavecchia et al. (1983) finden eine Frequenz von 0,02 bis 0,05 % der B-Zellen aus

dem peripheren Blut. Im PWM-Modell bestimmt Saxon dagegen nur 0,001 bis 0,007 % der peripheren B-Zellen. Wenn diese Zahlen auf die Bedingungen in einer 1,5 ml Kultur mit $1,5 \times 10^6$ Lymphozyten und einem Anteil der B-Zellen von 15 % hochgerechnet werden, ergeben sich folgende Zahlen:

im Helferzellsystem: 45 - 112 Vorläuferzellen

im PWM-System: 2 - 15 Vorläuferzellen

Diese unterschiedlichen Zahlen machen deutlich, wie wenig effektiv die PWM-Stimulation gegenüber der Methode von Lanzavecchia ist. Es muß davon ausgegangen werden, daß hier unterschiedliche Stimulationsmechanismen mit den verschiedenen Aktivierungsmethoden angesprochen wurden. Die Zahlen des PWM-Systems machen aber deutlich, welche statistischen Fehler in diesem Modell bei einer 1,5 ml Kultur möglich sind. Allein durch das Aussäen der Zellen in den Kulturen ist bei durchschnittlich 10 Vorläuferzellen pro Kultur ein theoretischer Fehler von mindestens 30 % möglich. Beim Anlegen von Triplikaten kann auch keine Normalverteilung der Zellen erreicht werden. Die statistische Auswertung derartiger Ansätze könnte sich aus diesem Grund schon sehr schwierig gestalten. Die Problematik der großen Schwankungen in der Messung der IgE-Produktion hat sich auch in den vorliegenden Versuchen immer wieder gezeigt. Trotz dieser statistischen Einschränkungen ist es jedoch in den meisten Fällen nicht gelungen, eine PWM-Stimulation nachzuweisen. Bei Berücksichtigung der Zahlen von Saxon müßte auch in den vorgelegten Experimenten eine Stimulation zu beobachten gewesen sein: Saxon berechnet für jede IgE-produzierende B-Zelle eine 7-Tagesproduktion von 400 pg. Bei einer durchschnittlichen Anzahl von 10 Vorläuferzellen in einer 1,5 ml Kultur müßten dann gegenüber einer PWM-freien Kultur nach sieben Tagen 4000 pg IgE produziert worden sein. Der theoretische Fehler in der Verteilung der Vorläuferzellen würde etwa 30 % (entsprechend 800 pg IgE nach 7 Tagen) ausmachen. Der Unterschied zu der PWM-freien Kultur wäre immer noch groß genug, um mit den Meß-

methoden nachgewiesen zu werden. Wie bereits oben erwähnt, wurde ein derartiger Effekt nur in einer von 18 Kulturen allergischer Spender nachgewiesen. Saxon et al. (1981) erklären sich die Differenzen zu den anderen Autoren mit den unterschiedlichen Spenderkollektiven, die ihnen zur Verfügung standen. Die Spender stammten aus Südkalifornien und waren während der Untersuchungszeit zwischen März und August einem ständigen Pollenflug exponiert gewesen. Obwohl die Spender als nichtallergisch klassifiziert wurden, resultierte die Pollenexposition nach Ansicht der Autoren möglicherweise in einer in-vivo-Voraktivierung der IgE-B-Zellen. Diese Voraktivierung könnte sie besonders sensibel für eine PWM-Stimulierung machen, so daß eine größere Anzahl von Vorläuferzellen in der Kultur bereitsteht.

In den hier vorgelegten Ergebnissen konnte bei dem Patientenkollektiv der Bäckerasthmatiker, das beruflich dem als Allergen wirkenden Mehlstaub ausgesetzt war, nur in einer von 18 Kulturen eine PWM-stimulierte IgE-Produktion nachgewiesen werden. Saxon weist die Stimulation bei nahezu allen gesunden Spendern nach. Zusammengekommen scheint es so zu sein, daß in den Händen der meisten Untersucher die PWM-Wirkung auf die IgE-Produktion deshalb so gering ist, daß sie nicht nachgewiesen werden kann. Das kann an der geringen Anzahl der aktivierbaren Helferzellen und B-Zellen liegen, es erscheint aber auch möglich, daß in der Differenzierung der IgE-produzierenden B-Zellen ganz andere Mechanismen eine Rolle spielen, die nicht mit den anderen Immunglobulinklassen zu vergleichen ist.

In diesem Zusammenhang ist eine Veröffentlichung erwähnenswert, in der berichtet wird, daß die Subklasse IgA₂ in PWM-stimulierten PBL-Kulturen nicht zu stimulieren war (Conley, 1982). Die IgA₂-Vorläuferzellen, die auf die PWM-induzierten Helferfaktoren reagieren konnten, waren möglicherweise nur in der Mucosa vorhanden. Analog dazu sollte für die IgE-Vorläufer-

zellen diskutiert werden, in welchen lymphatischen Geweben der bevorzugte Aufenthaltsort der IgE-Vorläuferzellen ist.

4.4.3. Schlußfolgerung

Die Resultate lassen zusammenfassend folgendes erkennen:

1. Eine PWM-stimulierte IgE-Produktion läßt sich nur in einzelnen Fällen nachweisen.
2. Eine generelle Stimulation ist unter getesteten Bedingungen nicht nachzuweisen.
3. Die PWM-Stimulation ist kein geeignetes Modell für die Entwicklung einer IgE-Antwort.

Ausblick:

Die erwähnten isotypenspezifischen Helferzellklone (Lanzavechia, 1983) lassen hoffen, daß in Zukunft bessere Aktivierungsmodelle für IgE bereitstehen. Auch der Einsatz von IgE-spezifischen Helferfaktoren (Saryan, 1983) aus den T-Zellen von Patienten mit einem Hyper-IgE-Syndrom (Saryan, 1983) kann neue Möglichkeiten der Regulationsanalyse eröffnen.

4.5. Bestimmung der Helferaktivitäten in isolierten B-Zellkulturen

4.5.1. Das Meßsystem

Die Experimente mit PWM-aktivierten PBL-Kulturen haben gezeigt, wie variabel die induzierbare Ig-Produktion aufgrund experimenteller und spenderspezifischer Parameter der Lymphozytenkultur sein kann. Zelldichte, PWM-Konzentration und individuelle Eigenschaften der Spender-PBL hatten einen Einfluß auf die Ig-Produktion. Die B-Zelldifferenzierung war letztendlich vom Verhältnis der Hilfe und Suppression abhängig, die von den regulatorischen T-Zellen bzw. ihren Mediatoren geleistet wurde. Die Fähigkeit der B-Zellen, auf

die PWM-Stimulation zu reagieren, konnte in diesem System nicht eindeutig beurteilt werden. Bei fehlenden Stimulationen der Ig-Produktionen war es durchaus möglich, durch Variation von PWM-Konzentration, Zelldichte oder durch Entfernung von PWM nach zwei Tagen Vorinkubation eine positive Stimulation der Ig (M, G, A)-Produktion zu erhalten.

Um diese vielfältigen Einflüsse der regulatorischen T-Zellen einzugrenzen und zu kontrollieren, wurde ein Kultursystem etabliert, dessen Lymphozyten von T-Zellen und adhärenenten Makrophagen/Monozyten befreit wurde. Eine direkte, polyklonale Aktivierung der B-Zellen war notwendig, um die Zellen reaktiv auf Helferfaktoren zu machen. Für diese Zwecke war der Einsatz von fixierten *Staphylococcus aureus* Cowan I -Zellen (SAC) erfolgreich. Die B-Zellen transformierten innerhalb von zwei Tagen zu großen, aktivierten Blasten, die über eine Dichtegradientenzentrifugation von den kleinen, ruhenden B-Zellen abgetrennt werden konnten. Diese Methode nach Wrigley (1983) bewährte sich in den vorliegenden Experimenten.

Negativkontrollen:

Es war für die Durchführung der Experimente wichtig, die mögliche Kontamination der B-Zellen mit T-Zellen zu kontrollieren. Nach der zweiten T-Zelldepletion durch Rosettierung waren weniger als 0,5 % rosettierende T-Zellen nachzuweisen. Für die Beurteilung der Reinheit wurde aber mehr Wert auf die Negativkontrollen mit den Lektinen PWM, ConA und PHA gelegt. Die mitogene Wirkung dieser Lektine hätte sich bei Anwesenheit von T-Zellen und Makrophagen/Monozyten in einer starken Erhöhung des Thymidineinbaus bemerkbar gemacht. Wenn jedoch diese Lektinkontrollen sich nicht von der Mediumkontrolle im Thymidineinbau unterschieden, war dies ein Beleg für die Abwesenheit von T-Zellen. Eine Lymphokinkaskade konnte in der isolierten B-Zellkultur ohne T-Zellen und Makrophagen/Monozyten nicht ablaufen.

Zeigte jedoch der Thymidineinbau in den Testkulturen eine Reaktion auf die Lektine, wurde das Ergebnis des Experimentes verworfen. In der Regel war dies in weniger als 10 % der Fälle nötig.

BCGF-Nachweis:

Die Reaktionsbereitschaft der B-Zellblasten konnte bei Zugabe von geeigneten Faktoren demonstriert werden. Der PWM-induzierte PBL-Überstand (PWM-Sup) war eine ausreichende Quelle für lösliche Helferfaktoren. Die Fähigkeit des PWM-Sup, die DNA-Synthese der B-Zellblasten zu unterstützen, ließ sich eindeutig nachweisen. Es gelang die Messung dieses Effektes zu optimieren, indem der Thymidineinbau etwa zwischen der 55. und 72. Stunde nach dem Beginn der Testkultur bestimmt wurde. Der Nachweis der stimulatorischen Wirkung von PWM-Sup gelang mit $0,5 - 1 \times 10^4$ Blasten pro 150 μ l Ansatz. Diese Aktivität des Überstandes konnte als BCGF-Aktivität angesprochen werden, obwohl keine Messung der Zellproliferation durch Zellzählung durchgeführt wurde. Bei einer relativ hohen Absterberate von Lymphozyten in Kultursystemen erscheint die Messung der Proliferation durch Zellzählung nicht sinnvoll.

In anderen Veröffentlichungen wurde ebenfalls die DNA-Synthese bzw. der Thymidineinbau von aktivierten B-Zellen als Maß für die BCGF-Aktivität benutzt (Falkoff, 1982; Muraguchi, 1982; Wrigley, 1983). Ob es gerechtfertigt ist, proliferative und BCGF-Aktivität gleichzusetzen, kann nur in Testsystemen geklärt werden, in denen die Proliferation einzelner B-Zellen verfolgt wird.

BCDF-Nachweis:

Auch die Produktion von Immunglobulinen in den B-Zellkulturen war bei der Anwesenheit von aktiven Helferüberständen (PWM-Sup und CASS) relativ gut meßbar. Während andere Autoren die Differenzierung der Plasmazellen mit der aufwendigen "plaque-

forming-cell" (PFC)-Methode messen (Wrigley, 1983; Falkoff, 1982; Mayer, 1982; Ralph, 1984), wurde dagegen in der vorliegenden Arbeit die freigesetzte Immunglobulinmenge im Kulturüberstand gemessen. Die empfindlichen RIAs erlaubten eine Verdünnung der Überstände bis 1 : 10, so daß von den ca. 100 µl Kulturüberstand IgM, IgG und IgA gemessen werden konnten. Die Menge reichte allerdings nicht für die IgE-Messung aus. Hier müssen in der Zukunft entweder empfindlichere Methoden oder größere Kulturen eingesetzt werden. Die Menge der präparierten B-Zellblasten von einer 200 ml Blutspende reichte nur etwa für 20 verschiedene Ansätze in 150 µl Kultursystem. Die Vorteile der RIA-Messung von Überständen waren:

1. die einfache Handhabung, die Überstände wurden eingefroren und bei Gelegenheit im RIA gemessen,
2. die Genauigkeit und Empfindlichkeit, Nachweisgrenze lag bei 2 - 10 ng/ml,
3. isotypenspezifische Ig (M, G, A)-Messung,
4. geringer Verbrauch an Antikörpern für den RIA, im Gegensatz zur PFC-Methode.

Außerdem war die Empfindlichkeit der BCDF-Bestimmung ähnlich wie im Thymidineinbau. Pro 150 µl Kultur reichte eine Menge von $1 - 5 \times 10^4$ Blasten (etwa $0,7 - 3,3 \times 10^5$ /ml) aus, um einen Effekt durch Helferfaktoren zu demonstrieren.

Die Konzentrationsmessung von Immunglobulinen in den B-Zellkulturen scheint sich auch bei anderen Autoren durchzusetzen (Falkoff, 1984). Die Größenordnungen der produzierten Immunglobuline unterschied sich allerdings von den dort gemessenen Konzentrationen. Während in der vorliegenden Arbeit bei der Mediumkontrolle und den Lektinkontrollen weniger als 0,6 pg IgM pro Zelle in fünf Tagen produziert werden, ist bei Falkoff (1984) eine Produktion von etwa 5 pg IgM pro Zelle in sieben Tagen zu verzeichnen, das bedeutet eine sehr viel höhere Spon-

tanproduktion als in der vorliegenden Arbeit. Die Gründe für diesen Unterschied liegen wahrscheinlich in der unterschiedlichen Aufbereitung der B-Zellblasten. Bei der zitierten Arbeit wurde keine spezielle Blastenisolierung nach der SAC-Aktivierung vorgenommen. Möglicherweise war deshalb die benutzte Zellpopulation weniger einheitlich. Die unterschiedlichen Kulturbedingungen (FCS-Chargen etc.) können natürlich auch eine entscheidende Rolle spielen.

Nachweis von BCDF neben BCGF:

Die Messung der Helferaktivität BCDF, die proliferierende B-Zellblasten zur Ig-Sekretion treibt, ist aus folgenden Gründen schwierig zu beurteilen:

In der vorliegenden Arbeit wurden Helferfaktoren benutzt, die in den Überständen PWM oder ConA-Sepharose aktivierter PBL-Kulturen enthalten waren. Diese Überstände enthalten sehr wahrscheinlich eine Vielfalt von verschiedenen Lymphokinen, so auch BCGF und BCDF nebeneinander. Das Problem bestand jedoch darin, daß der BCDF-Aktivität eine BCGF-Aktivität in der Blastenkultur vorangehen muß oder kann, und daß somit die Stärke der BCGF-Aktivität indirekt die mögliche Ig-Sekretion beeinflusst. Im Extremfall wäre es denkbar, daß der zu messende Überstand genügend BCDF aber kein BCGF enthält. Eine BCDF-Aktivität wäre dann nicht meßbar, wenn die vorausgehende Blastenproliferation die Vorbedingung für die Differenzierung ist. Eine ideale Lösung wäre in diesem Fall die gleichzeitige Anwesenheit von einem BCDF-freien BCGF-Präparat, etwa aus den Überständen konierter T-Zellhybridome (Butler, 1983).

Die Frage, ob die B-Zelldifferenzierung eine Proliferation unter dem Einfluß von BCGF voraussetzt, ist in der Literatur bis jetzt nicht zufriedenstellend beantwortet worden. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnten Falkoff et al. (1984) mit einer monoklonalen BCDF-Quelle aus einem humanen T-Zellhybridom zeigen, daß die Ig-Sekretion auch ohne die Anwesenheit von BCGF durch BCDF in SAC-aktivierten B-Zellen einge-

leitet werden kann. Allerdings wurden in dieser Arbeit durch das monoklonale BCDF gleichzeitig die IgM-, IgG- und IgA-Sekretion eingeleitet, so daß es sich hier im Gegensatz zu anderen monoklonalen BCDFs (Mayer et al., 1982) nicht um einen isotypenspezifischen Differenzierungsfaktor handeln kann. Die bis jetzt beschriebenen BCDFs scheinen in ihrer Wirkung je nach Testsystem recht heterogen zu sein. Auch hier sollte es in Zukunft möglich sein, die Aktivitäten der unterschiedlichen Faktoren in einheitlichen Testsystemen besser gegeneinander abzugrenzen.

Die Messung der Aktivität, die die kultivierten Blasten zur Ig-Produktion bringt, kann jedoch in der vorliegenden Arbeit voraussetzen, daß in den Überständen eine ausreichende Menge von BCGF vorhanden ist. Bei PWM-induzierten Überständen war das in allen gemessenen PWM-Sups der Fall. Mit Einschränkung galt dies auch für die CASS-Überstände. Deren BCGF-Aktivität lag in den meisten Fällen quantitativ darunter. In der Regel waren jedoch beide Aktivitäten in den Überständen zu beobachten.

Die Reaktion der B-Zellblasten war sowohl vom Überstand, als auch von der Herkunft der Testzellen abhängig.

4.5.2. Isotypenspezifische Effekte

Je nach Überstand (PWM-Sup oder CASS) konnten in einem Experiment bei der isotypenspezifischen Ig-Sekretion Unterschiede in der Stimulation festgestellt werden. Diese Unterschiede waren in identischen Testpopulationen zu beobachten, so daß individuelle Reaktionsmuster der B-Zellblasten ausgeschlossen waren. Das Ergebnis des Experimentes war ein Beleg dafür, daß in der Blastenkultur verschiedene Differenzierungsfaktoren angreifen konnten und isotypenspezifischen Charakter haben mußten. Gleiche Testzellpopulationen konnten bei der Anwesenheit von unterschiedlichen Überständen mit der isotypenspezifischen Ausdifferenzierung zu Plasmazellen reagieren. In-

direkt war das ein Beleg für die Existenz von isotypenspezifischen Differenzierungsfaktoren (BCDFmy, -gamma, -alpha). Damit wurde bestätigt, was mit monoklonalen BCDFs in der Maus für IgM (Pure, 1983) und beim Menschen für IgA (Mayer, 1982) gezeigt worden ist.

Bei der Verwendung unterschiedlicher Testzellpopulationen ist in den vorliegenden Experimenten auffällig, daß die Blastenkulturen spenderspezifisch mit einem isotypenspezifischen Muster reagieren können. In den betreffenden Experimenten wurde gezeigt, daß nicht alle Blastenpräparationen in gleicher Weise zur IgA-Produktion stimuliert werden konnten. Überstände, in denen vorher BCDFalpha nachgewiesen wurde, konnten in einem Fall keine IgA-Produktion stimulieren. Offensichtlich spielt hier die individuelle Herkunft und Vorgeschichte der Testzellen eine Rolle. Es ist denkbar, daß in vivo Situationen vorgeherrscht haben, die eine Bereitstellung von IgA-produzierenden B-Zellen nicht zuließen. In der Testkultur müßten demnach im Normalfall B-Zellen vorhanden sein, die bereits in vivo einen Ig-Switch vollzogen haben und sich auf ihre zukünftige Immunglobulinklasse spezialisiert haben. Der Ig-Switch, der die membrangebundenen Immunglobuline betrifft, würde eine Palette der verschiedenen B-Zellen bereitstellen, die durch die isotypenspezifischen Helferfaktoren (BCDFalpha, -gamma, -my) zur Differenzierung in Plasmazellen gebracht werden können. Im oben erwähnten Experiment könnte es bedeuten, daß in der betreffenden Testkultur keine IgA-positive B-Zellen für die entsprechenden Helferfaktoren bereitstanden.

4.5.3. Die Wirkung von CASS

Die Kultur von isolierten B-Zellen erlaubte es, die suppressive Wirkung von CASS, die in der PWM-aktivierten PBL-Kultur die Ig (M, G, A)-Produktion hemmte, direkt auf differenzierende B-Zellen zu untersuchen.

Wenn zu diesem Zweck CASS gleichzeitig mit PWM-Sup den voraktivierten B-Zellen angeboten wurde, war kein suppressiver Effekt zu bemerken, weder in der B-Zellproliferation noch in der Immunglobulinproduktion. Wie bereits erwähnt, hatte CASS (ohne PWM-Sup) helfende Aktivität in der B-Zelldifferenzierung. Zusammengekommen war dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, daß CASS seine supprimierenden Aktivitäten nur über regulatorische T-Zellen ausüben konnte.

CASS war ein Überstand, der in den beschriebenen Experimenten eine Vielfalt von biologischen Aktivitäten nebeneinander aufwies. Die Helferaktivitäten für aktivierte B-Zellen (BCGF und BCDF) unterstützten die Ig-Produktion. Die supprimierende Aktivität unterstützte die Aktivierung der T-Suppressorzell-Kaskade. Eine TCGF-Aktivität war ebenfalls nachweisbar.

Im isolierten B-Zellsystem konnte jedoch nur die B-Zellhelferaktivitäten zur Wirkung kommen, weil die entsprechenden Responder-Zellen (nämlich T-Suppressorzellen) für die anderen Aktivitäten fehlten.

4.5.4. Dialysierte Helferfaktoren

Der Einsatz von dialysierten Überständen machte deutlich, daß die verantwortlichen Moleküle der Helferaktivität ein größeres Molekulargewicht als 5000 hatten. Das stand im Einklang mit der Literatur, wo ein Molekulargewicht für BCGF von 18 - 20.000 (Butler, 1983) und für BCDF von 20.000 bzw. 35.000 (Hirano, 1984) gefunden wurde. Die Dialyse von Kulturmedium zeigte, daß im foetalem Kälberserum (FCS), das zu 10 % dem Medium zugesetzt wurde, eine supprimierende Aktivität nachzuweisen war. Um diese unspezifischen Einflüsse der kleinen FCS-Moleküle auszuschalten, wäre es zu empfehlen, einen synthetischen, aber vollwertigen Serumersatz zu entwickeln.

4.5.5. Schlußfolgerung

Zusammenfassend sind aus den Experimenten mit isolierten und SAC-voraktivierten B-Zellblasten die folgenden Erkenntnisse gewonnen worden:

1. Die B-Zellblastenkultur eignete sich dazu, die Produktion von Helferaktivitäten in gemischten PBL-Kulturen zu messen. Die Fähigkeit von individuellen Spendern, die für die B-Zelldifferenzierung wichtigen Faktoren (BCGF und BCDF) zu bilden, konnte gemessen werden. Sowohl die Aktivierung mit PWM als auch mit ConA-Sepharose eignete sich dafür. Obwohl bei ConA-Sepharose quantitativ nicht so viele Faktoren gebildet wurden, hatte dieser Überstand den Vorteil, frei von Lektinen zu sein.
2. Das Verfahren eignete sich ebenfalls dafür, die Aktivierbarkeit der isolierten B-Zellen und ihre Fähigkeit zu Proliferation und Differenzierung zu untersuchen.
3. Sowohl der zelluläre als auch der faktorielle Aspekt der B-Zelldifferenzierung konnte isotypenspezifisch untersucht werden. Es gab deutliche Hinweise auf die Existenz von isotypenspezifischen Helferfaktoren im humanen System.

5. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit ist es gelungen, die polyklonale Differenzierung von humanen B-Zellen unter Kulturbedingungen darzustellen. Für die Erfassung der isotypenspezifischen Ig-Produktion konnten hochspezifische RIAs etabliert werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Immunglobulinproduktion von ungetrennten peripheren Blutlymphozyten (PBL) mit Pokeweed Mitogen (PWM) stimuliert. Im zweiten Teil wurden isolierte B-Zellen in getrennten Schritten aktiviert und mit löslichen Helferfaktoren zur Proliferation und Sekretion gebracht. Die Bedingungen für die PWM-induzierte Ig-Produktion in PBL-Kulturen wurden optimiert. Zelldichte und PWM-Konzentration konnten die Ig-Produktion stark beeinflussen. Sowohl potenzierende als auch supprimierende Effekte wurden in dem System analysiert. Die optimalen Bedingungen für die Stimulation der Ig-Produktion waren individuell verschieden. Eine Langzeitstudie mit sechs allergischen Patienten deutete auf spender-spezifische Reaktionsmuster (PWM-Optima, Stimulationsindizes) hin. Zusätzliche Reagenzien wie Propranolol und Phorbolmyristat Acetat (PMA) konnten modulierend in die PWM-induzierte Immunglobulinproduktion eingreifen. Weiterhin konnte die supprimierende Aktivität von PWM in der späten Kulturphase (ab Tag 2 - 3) demonstriert und ausgeschaltet werden. Die isotypenspezifische Analyse der Ig-Produktion zeigte, daß PWM für die Stimulation der IgM-, IgG- und IgA-Produktion in PBL-Kulturen geeignet war. Eine Stimulation der IgE-Produktion durch PWM war trotz zahlreicher, oben erwähnter Manipulationen an den Kulturbedingungen und trotz eines allergischen Patientenkollektivs nicht nachzuweisen.

Regulatorische Faktoren für die PWM-induzierte Ig-Produktion konnten mit Hilfe von ConA-Sepharose in PBL-Kulturen induziert werden. Die gewonnenen Kulturüberstände waren mitogen- und lektinfrei. Dieser Vorteil gegenüber der bisherigen Literatur konnte die Austestung der supprimierenden Aktivität

erheblich vereinfachen. Die Faktoren des Überstandes (CASS) hatten in der PWM-haltigen Kultur eine suppressive und in der PWM-freien Kultur eine potenzierende Aktivität für die Ig (M,G,A)Produktion. Die suppressive Wirkung von CASS-Faktoren war spezifisch. Sie beeinträchtigte nicht den Thymidineinbau von PWM- oder ConA-transformierten PBL-Kulturen. Sie hatten keine inhibitorische Wirkung auf die aktive, sekretorische Leistung von IgE-produzierenden Myelomazellen (Zelllinie U-266). In aktivierten,proliferierenden und differenzierenden B-Zellkulturen konnten ebenfalls keine supprimierenden Aktivitäten von CASS festgestellt werden. Die supprimierende Aktivität von CASS wirkte nur indirekt auf die B-Zelldifferenzierung. Sie war nur in ungetrennten PBL-Kulturen in der Anwesenheit von PWM zu beobachten.

Zusammengenommen scheint die supprimierende Aktivität von CASS eine Unterstützung bzw. Beschleunigung der PWM-induzierten Suppression durch T-Zellen darzustellen. Neben der supprimierenden Aktivität konnte mit Hilfe von TCGF-abhängigen T-Zellkulturen eine geringe, aber signifikante TCGF-Aktivität demonstriert werden. In der isolierten B-Zellkultur zeigte CASS BCGF- und BCDF-Aktivitäten. Der Überstand CASS bildete also einen Pool für mehrere Lymphokine.

Für Ig (M, G, A) konnten isotypenspezifische Differenzierungseffekte im B-Zellsystem nachgewiesen werden. Verschiedene Überstände konnten unterschiedliche Stimulationen der Immunglobulinklassen hervorrufen. Die Versuche belegten die Existenz von unterschiedlichen Differenzierungsaktivitäten für die Ausbildung der isotypenspezifischen Plasmazellen im humanen System. Weiterhin konnte in dem isolierten B-Zellsystem die individuell unterschiedliche Häufigkeit von isotypenspezifischen Vorläuferzellen demonstriert werden.

Ausblick

Auf der einen Seite eröffnen die Experimente Testsysteme für die klinische Diagnostik. Das isolierte B-Zellsystem ist dabei dem PWM-PBL-System überlegen. Regulatorische Störungen der B-Zelldifferenzierung können funktionell Schritt für Schritt erfaßt werden:

1. Die Aktivierung von ruhenden B-Zellen mit Hilfe von *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC),
2. die Proliferation der aktivierten B-Zellen mit Hilfe von standardisierten Helferfaktoren,
3. die isotypenspezifische Differenzierung zu Plasmazellen mit Hilfe von Helferfaktoren,
4. die Produktion von Helferfaktoren (BCGF und BCDF),
5. die Produktion von lektinfreien Suppressorfaktoren.

Das isolierte B-Zellsystem bietet auf der anderen Seite die Möglichkeit, klonierte T-Zelllinien (T-Zellhybridome oder TCGF-abhängige T-Zelllinien) hinsichtlich ihrer Helferfunktion zu screenen.

Derartige humane T-Zelllinien und ihre Faktoren sind für die weitere Grundlagenforschung von großer Bedeutung. Sie sind ebenfalls die Voraussetzung für die Rekombinantentechnik, die es erlauben könnte, Gene für diese Faktoren in Bakterien zu transferieren. Die reine Darstellung von Helferfaktoren eröffnet dabei auch immunpharmakologische Perspektiven.

6. Literatur

Abo, T., and C. M. Balch. 1981.

A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1).

J. Immunol. 127: 1024.

Aman, P., J. Gordon, and G. Klein. 1984.

TPA (12-O- tetradecanoyl-phorbol -13-acetate) activation and differentiation of human peripheral B lymphocytes.

Immunology 51: 27.

Arai, S., H. Yamamoto, K. Hoh, and K. Kumagai. 1983.

Suppressive effect of human natural killer cells on pokeweed mitogen-induced B cell differentiation.

J. Immunol. 131: 651.

Barker, B. E., P. Farnes, and H. Fanger. 1965.

Mitogenic activity in *Phytolacca americana* (pokeweed).

Lancet 1: 170.

Bertoglio, J. H. 1983.

Monocyte-independent stimulation of human B lymphocytes by phorbol myristate acetate.

J. Immunol. 131: 2279.

Bird, A. G., and S. Britton. 1979.

A live human B-cell activator operating in isolation of the cellular influences.

Scand. J. Immunol. 9: 507.

Bismarck, U. v., D. Peest, R. Dräger, A. Lerbin,

M. Schlesier, H. H. Peter. 1984.

Terminale B-Zellreifung und Immunglobulinsynthese in vitro bei primären und sekundären Immundefekten.

Immun. Infekt. 12: 75.

Börjeson, J., R. Reisfeld, L. Chessin, P. D. Welski,
S. D. Douglas. 1966.
Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro.
I. Biological and physiochemical properties of the pokeweed
mitogen.
J. Exp. Med. 124: 859.

Bonnard, G. D., K. Yasaka, and R. D. Maca. 1980.
Continued growth of functional human T lymphocytes:
production of human T-cell growth factor.
Cell. Immunol. 51: 390.

Boyum, A. 1968.
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl.): 97.

Brodier, J., C. Bona, R. Ciorbaru, J. P. Revillard, and
L. Chedid. 1976.
A human T-independent B lymphocyte mitogen extracted from
Nocardia opaca.
J. Immunol. 117: 1434.

Brooks, K. L., D. Yuan, J. W. Uhr, P. H. Krammer, and
E. G. Vitetta. 1983.
Lymphokine-induced IgM secretion by clones of neoplastic
B-cells.
Nature 307: 825.

Brunda, M. J., L. Varesio, R. B. Herberman, and H.T. Holden.
1982.
Interferon-independent lectin-induced augmentation of murine
natural killer cell activity.
Int. J. Cancer 29: 299.

Buckley, R. H., P. M. Fiser, and W. G. Becker. 1981.

In vitro studies of IgE synthesis by human blood mononuclear cells.

Fed. Proc. 40: 2167.

Butler, J. L., A. Muraguchi, H. C. Lane, and A. S. Fanci. 1983.

Development of a human T-T cell hybridoma secreting B cell growth factor.

J. Exp. Med. 157: 60.

Cantor, H., and E. A. Boyse. 1975.

Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens.

I. Generation of functionally distinct T cell subclasses in a differentiative process independent of antigen.

J. Exp. Med. 141: 1376.

Capron, M., J. Rousseaux, C. Mazingue, H. Bazin, and A. Capron. 1978.

Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* schistosomula.

J. Immunol. 121: 2518.

Chen, S.-S., J. W. Bohn, F.-T. Liu, and D. H. Katz. 1981.

Murine lymphocytes expressing Fc receptors for IgE (FcR_E).

I. Conditions for inducing FcR_E + lymphocytes and inhibition of the inductive events by suppressive factor of allergy (SFA).

J. Immunol. 127: 166.

Chessin, L. N., J. Börjeson, P. D. Welsh, S. D. Douglas, and H. L. Cooper. 1966.

Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro.

II. Morphological and biochemical studies on the transformation of lymphocytes by pokeweed mitogen.

J. Exp. Med. 124: 873.

Chiorazzi, N., S. M. Fu, and H. G. Kunkel. 1979.
Induction of polyclonal antibody synthesis by human allogeneic
and autologous helper factors.
J. Exp. Med. 9: 1543.

Chiorazzi, N., D. A. Fox, D. H. Katz. 1976.
Hapten-specific IgE antibody response in mice.
VI. Selective enhancement of IgE antibody production by low
doses of X-irradiation and cyclophosphamide.
J. Immunol. 117: 1629.

Choi, Y. S., K. H. Lim, and F. K. Sanders. 1981.
Effect of interferon α on pokeweed mitogen-induced differentiation of human peripheral blood B lymphocytes.
Cell. Immunol. 64: 20.

Clement, L. T., M. K. Dagg, J. E. Lehmyer, and M. Kiyotoki.
1983.
Two phenotypically distinct suppressor T cell subpopulations
inhibit the induction of B cell differentiation by phyto-
hemagglutinin.
J. Immunol. 131: 1214.

Clement, L. T., M. K. Dagg, G. L. Gartland. 1984.
Small resting B cells can be induced to proliferate by
direct signals from activated helper T cells.
J. Immunol. 132: 740.

Conley, M. E., and W. J. Koopman. 1982.
In vitro regulation of IgA subclass synthesis.
I. Discordance between plasma cell production and antibody
secretion.
J. Exp. Med. 156: 1615.

Coombs, R. R. A., and P. G. H. Gell. 1975.
Classification of allergic reactions responsible for
clinical hypersensitivity and disease.
in: Clinical aspects of immunology.
ed.: P. G. H. Gell, R. R. A. Coombs, and P. J. Lachmann.
Blackwell publications, Oxford.

Cooper, M. D., R. D. A. Peterson, M. A. South, and R. A. Good.
1966.

The functions of the thymus and the bursa system in the
chicken.

J. Exp. Med. 123: 75.

Darvey, F. R., A. S. Kuree, and H. V. Lamberson. 1983.
Mouse rosette positive B cells fail to synthesize immuno-
globulin following incubation with pokeweed motogen.
Clin. Exp. Immunol. 54: 771.

Davis, A. J. S., R. L. Carter, E. Leuchars, V. Wallu, and
F. M. Dietrich. 1970.

The morphology of immune reactions in normal, thymectomized
and reconstituted mice.

III. Response to bacterial antigens: salmonella flagella
antigen and pneumococcal polysaccharide.

Immunology 19: 945.

Dessein, A. J., W. L. Parker, S. L. James, and J. R. David.
1981.

IgE antibody and resistance to infection.

I. Selective suppression of the IgE antibody response in
rats diminishes the resistance and the eosinophil response
to *Trichinella spiralis* infection.

J. Exp. Med. 153: 423.

Dintzis, R. Z., M. H. Middleton, and H. M. Dintzin. 1983.
Studies on the immunogenicity and tolerogenicity of
T-independent antigens.
J. Immunology 131 (5): 2196.

Dutton, R. W. 1975.
Suppressor T cells.
Transplantation Rev. 26: 39.

Einhorn, S., H. Blomgren, and H. Strander. 1978.
Interferon and spontaneous cytotoxicity of peripheral
lymphocytes by human leukocyte interferon.
Int. J. Cancer, 22: 405.

Elkins, K., and J. C. Cambier. 1983.
Constitutive production of a factor supporting B lymphocyte
differentiation by a T cell hybridoma.
J. Immunology 130: 1247.

Endres, R. O., E. Kushnir, J. W. Kappler, P. Marrack, and
S. C. Kimsky. 1983.
A requirement for nonspecific T cell factors in antibody
responses to "T cell independent" antigens.
J. Immunol. 130: 781.

Evans, R. L., J. M. Breard, H. Lazarus, and S. F. Schlossman.
1977.
Detection, isolation, and functional characterization of two
human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens.
J. Exp. Med. 145: 221.

Falkoff, R. J. M., J. L. Butler, C. A. Dinarello, and
A. S. Fauci. 1984.
Direct effects of a monoclonal B cell differentiation factor
and of purified interleukin 1 on B cell differentiation.
J. Immunol. 133: 692.

- Falkoff, R. J. M., L. P. Zhu, and A. S. Fauci. 1982.
Separate signals for human B cell proliferation and
differentiation in response to *Staphylococcus Aureus*:
evidence for a two-signal model of B cell activation.
J. Immunol. 129: 97.
- Farnes, P., B. E. Barker, L. E. Brownhill, and H. Fanger.
1964.
Mitogenic activity in *Phytolacca americana* (pokeweed).
Lancet 2: 1100.
- Fauci, A. S., K. R. K. Pratt, and G. Whalen. 1976.
Activation of human B lymphocytes.
II. Cellular interactions in the PFC response of human
tonsillar and peripheral blood B lymphocytes to polyclonal
activation by pokeweed mitogen.
J. Immunology 117: 2100.
- Fiser, P. M., and R. H. Buckley. 1979.
Human IgE biosynthesis in vitro: studies with atopic and
normal blood mononuclear cells and subpopulations.
J. Immunol 123: 1788.
- Fleisher, T. A., W. C. Greene, R. M. Blaese, and T. A.
Waldman. 1981.
Soluble suppressor supernatants elaborated by concanavalin
A-activated human mononuclear cells.
II. Characterization of a soluble suppressor of B cell
immunoglobulin production.
J. Immunol. 126: 1192.
- Fleisher, T. A., A. M. Attallah, G. Tosato, R. M. Blaese,
and W. C. Greene. 1982.
Interferon-mediated inhibition of human polyclonal immuno-
globulin synthesis.
J. Immunol. 129: 1099.

Friedman, S. M., and G. S. Thompson. 1983.

Functionally restricted, allospecific, human helper T cell lines that amplify either B cell or cytolytic T cell responses.

J. Exp. Med. 157: 1675.

Garchon, H.-J., M. Levi-Strauss, C. Carnaud, and J.-F. Bach. 1983.

Soluble factors for B cell activation: a T cell hybridoma that secretes a specific B cell growth factor.

J. Immunology 130: 777.

Gathings, W. E., A. R. Lawton, and M. D. Cooper. 1977.

Immunofluorescent studies on the development of pre-B cells, B-lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans.

Eur. J. Immunol. 7: 804.

Geha, R. S., and M. Communale. 1983.

Regulation of immunoglobulin E antibody synthesis in man by antiidiotypic antibodies.

J. Clin. Invest 71: 46.

Gerrard, T. L., and A. S. Fauci. 1982.

Activation and immunoregulation of antigen-specific human B lymphocyte responses: multifaceted role of the monocyte.

J. Immunol. 128: 2367.

Glick, B., T. S. Chang, and R. G. Jaap. 1956.

The bursa of Fabricius and antibody productions.

Poultry Sc. 35: 224.

Goldsby, R. A., B. A. Osborne, E. Simpson, and L. A. Herzenberg. 1977.

Hybrid cell lines with T-cell characteristics.

Nature 256. 707.

Good, R. A., A. P. Dalmasso, C. Martinez, O. K. Archer,
J. C. Piera, and B. W. Papermaster. 1962.

The role of the thymus in development of immunologic
capacity in rabbits and mice.

J. Exp. Med. 116: 773.

Härfast, B., J. R. Huddleston, P. Casali, T. C. Merijon,
and M. B. A. Oldstone. 1981.

Interferon acts directly on human B lymphocytes to modulate
immunoglobulin synthesis.

J. Immunol. 127: 2146.

Haynes, B. F., and A. S. Fauci. 1977.

Activation of human B lymphocytes.

III. Concanavalin A induced generation of suppressor cells
of the plaque-forming cell response of normal human B
lymphocytes.

J. Immunol. 118: 2281.

Heijnen, C. J., F. Uytdehaag, K. H. Pot, and R. E. Ballieux.
1981.

Antigen-specific human T cell factors.

I. T cell helper factor: biologic properties.

J. Immunology 126: 497.

Hovmark, A., and E. Asbrink. 1981.

Effects of a beta-receptor blocking agent (propranolol) on
synthesis of IgE in vitro by peripheral blood lymphocytes
from atopic patients.

Allergy 36: 391.

Howard, M., and W. E. Paul. 1983.

Regulation of B-cell growth and differentiation by soluble
factors.

Ann. Rev. Immunol. 1: 307.

Hunter, W. M. 1978.

Radioimmunoassay

in: Handbook of experimental immunology,

ed: Weir, D. M., chapter 14, Blackwell, London.

Ishizaka, K., and T. Ishizaka. 1978.

Mechanisms of reaginic hypersensitivity and IgE antibody response.

Immun. Rev. 41: 109.

Ishizaka, K. 1984.

Regulation of IgE-Synthesis.

Ann. Rev. Immunol. 2: 159.

Ishizaka, K., and K. Sandberg. 1981.

Formation of IgE binding factors by human T lymphocytes.

J. Immunol. 126: 1692.

Jarrett, E. E., D. M. Haig, and H. Bazin. 1976.

Time course studies on rat IgE production in *N. brasiliensis* infection.

Clin. Exp. Immunol. 24: 346.

Jones, B. M. 1983.

Kinetic analysis of subset growth and B-cell activation in pokeweed mitogen-stimulated cultures of periphered blood mononuclear cells depleted of or enriched for OKT 8+ cells.

Scand. J. Immunol. 18: 399.

Kaieda, T., M. Okada, N. Toshimura, S. Kishimoto,

Y. Yamamura, and T. Kishimoto. 1982.

A human helper T cell clone secreting both killer helper factor(s) and T cell-replacing factor(s).

J. Immunology 129: 46.

Kasakura, S., M. Taguchi, T. Murachi, H. Uchino, and M. Hanaoka. 1983.

A new mediator (suppressor cell induction factor) activating T cell mediated suppression: characterization of suppressor cells, Kinetics of their generation, and mechanism of their action.

J. Immunol. 131: 2307.

Keightley, R. G., M. D. Cooper, and A. R. Lawton. 1976.

The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen.

J. Immunol. 117: 1538.

Köhler, G., and C. Milstein. 1975.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of a predefined specificity.

Nature 256: 495.

Kuritani, T., and M. D. Cooper. 1982.

Human B cell differentiation.

III. Enhancing effect of monoclonal anti-immunoglobulin D antibody on pokeweed mitogen-induced plasma cell differentiation.

J. Immunol. 129: 2490.

Kappler, J. W., B. Shidmore, J. White, and P. Marrack. 1981.

Antigen-inducible, H-2 restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition.

J. Exp. Med. 153: 1198.

Kasakura, S., M. Taguchi, Y. Watanabe, T. Okubo, T. Murachi, H. Uchino, and M. Hanaoka. 1983.

Suppressor cell induction factor: a new mediator released by stimulated human lymphocytes and distinct from previously described lymphokines.

J. Immunol. 130: 2720.

Katz, D. H. 1978.

The allergic phenotype: manifestation of allergic breakthrough and imbalance in normal damping of IgE antibody production.

Immunol. Rev. 41: 77.

Kessler, S. W. 1975.

Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.

J. Immunol. 115: 1617.

Klinman, N. R., and R. B. Taylor. 1969.

General methods for the study of cells and serum during the immune response: the response to dinitrophenyl in mice.

Clin. Exp. Immunol. 4: 473.

König, W., P. Pfeiffer, B. Szperalski, and A. Bohn. 1981.

Membrane biochemical events in mast cell and basophil activation and secretion.

Behring Inst. Mitt. 68: 30.

König, W., and K. Ishizaka. 1976.

Binding of rat IgE with the subcellular components of normal rat mast cells.

Immunochemistry 13: 345.

Kowal, R., and R. G. Parsons. 1980.

Stabilization of proteins immobilized on sepharose from leakage by glutaraldehyde crosslinking.

Analytical Biochemistry 102: 72.

Lanzavecchia, A., and B. Parodi. 1984.

In vitro stimulation of IgE production at a simple precursor level by human alloreactive T helper clones.

Clin. Exp. Immunol. 55: 197.

Leanderson, T., E. Lundgren, E. Ruuth, H. Borg, H. Persson, and A. Coutinho. 1982.

B-cell growth factor: Distinction from T-cell growth factor and B cell maturation factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7455.

Ledbetter, J. A., R. L. Evans, M. Lipinski, C. Cunningham-Rundles, R. A. Good, and C. A. Herzenberg. 1981.

Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man.

J. Exp. Med. 153. 310.

Leder, P. 1982.

The genetics of antibody diversity.

Scientific American 1982 (5): 72.

Leibson, H. J., P. Marrack, and J. Kappler. 1982.

B cell helper factors.

II. Synergy among three helper factors in the response of T cell- and macrophage-depleted B cells.

J. Immunology 129: 1398.

Leonhard, W. J., J. M. Depper, T. Uehiyama, K. A. Smith, T. A. Waldman, and W. C. Greene. 1982.

A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor.

Nature 300: 267.

Lernhardt, W., C. Corbel, R. Wall, and F. Melchers. 1982.

T-cell hybridomas which produce B lymphocyte replication factors only.

Nature 300: 355.

Matsumoto, T., K. Yoshioka, Y. Miyamoto, Y. Harada, and M. Shimamura. 1981.

IgE biosynthesis and IgE-bearing cells in atopic and normal peripheral blood.

Annals of Allergy 47: 47.

Mayer, L., S. M. Fu, and H. G. Kunkel. 1982.

Human T-cell hybridomas secreting factors for IgA-specific help, polyclonal B cell activation and B cell proliferation.

J. Exp. Med. 156: 1860.

Miller, J. F. A. P., and G. F. Mitchell. 1968.

Cell to cell interaction in the immune response.

I. Haemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes.

J. Exp. Med. 128: 801.

Mitchison, N. A. 1971.

The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation.

Eur. J. Immunol. 1: 18.

Miyawaki, T., N. Moriya, T. Nagasaki, M. Kubo, T. Yokei, and N. Taniguchi. 1981.

Mode of action of humoral suppressor factor derived from pokeweed mitogen-stimulated cord T cells on adult B cell differentiation.

J. Immunology 126: 282.

Monroe, J. G., and J. C. Cambier. 1983.

B cell activation. II. Receptor cross-linking by thymus-independent and thymus-dependent antigens induces a rapid decrease in the plasma membrane potential of antigen-binding B lymphocytes.

J. Immunol. 131: 2641.

Moretta, L., S. R. Webb, C. E. Gross, P. M. Lydyard, and M. D. Cooper. 1977.

Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG.

J. Exp. Med. 146: 184.

Mosier, D. E., J. J. Mond, and E. A. Goldings. 1977.

The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect.

J. Immunol. 119: 1874.

Muraguchi, A. and A. S. Fauci. 1982.

Proliferative responses of normal human B lymphocytes.

Development of an assay system for human B cell growth factor (BCGF).

J. Immunol. 129: 1104.

Nabel, G., W. J. Allard, and H. Cantor. 1982.

A cloned cell line mediating natural killer cell function inhibits immunoglobulin secretion.

J. Exp. Med. 156: 658.

Nilsson, K. 1971.

High-frequency establishment of human immunoglobulin-producing lymphoblastoid lines from normal and malignant lymphoid tissue and peripheral blood.

Int. J. Cancer 8: 432.

Ogilvie, B. M. 1964.

Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasite.

Nature 204: 91.

Okada, M., N. Yoshimura, T. Kaieda, Y. Yamamura, and T. Kishimoto. 1983.

Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7717.

Orr, T. S. C., P. A. Riley, and J. E. Doe. 1971.

Potentiated reagin response to egg albumin in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats.

III. Further studies on the time course of the reagin response.

Immunology 26: 185.

Palacios, R. 1982.

Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation.

J. Immunol. 128: 337.

Palacios, R., and G. Möller. 1981.

T cell growth factor abrogates concanavalin A-induced suppressor cell function.

J. Exp. Med. 153: 1360.

Parker, D. C. 1982.

Separable helper factors support B cell proliferation and maturation to Ig secretion.

J. Immunol. 129: 469.

Peavy, D. L., and C. W. Pierce. 1974.

Cell-mediated immune responses in vitro.

I. Suppression of the generation of cytotoxic lymphocytes by concanavalin A and concanavalin A-activated spleen cells.

J. Exp. Med. 140: 356.

Pettersson, S., G. Pobor, A. Bandeira, and A. Coutinho. 1983.
Distinct helper activities control growth or maturation of
B lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 13: 249.

Pfeiffer, P., W. König, and A. Bohn. 1983.
Genetic dependence of IgE-antibody production in mice infected
with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*.
I. Modulation of the IgE antibody response in vivo by serum
factors.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 72: 347.

Pike, B. L., and G. J. V. Nossal. 1984.
A reappraisal of "T-independent" antigens.
I. Effect of lymphokines on the response of single adult
hapten-specific B lymphocytes.
J. Imm. 132: 1687.

Pike, B. L., D. L. Vaux, I. Clark-Lewin, J. W. Schrader,
and G. J. V. Nossal. 1982.
Proliferation and differentiation of single hapten-specific
B lymphocytes is promoted by T-cell factor(s) distinct from
T-cell growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6350.

Puck, J. M., S. L. Abramson, and R. R. Rich. 1982.
Bromodeoxyuridine and light treatment enhances responsiveness
of pokeweed mitogen stimulated human lymphocytes to autologous
and allogenic determinants.
Cell. Immunol. 72: 102.

Puck, J. M., R. R. Rich. 1984.
Regulatory interactions governing the proliferation of
T cell subsets stimulated with pokeweed mitogen.
J. Immunol. 132: 1106.

Pure, E., P. C. Isakson, K. Takatsu, T. Hamaoka, S. L. Swain, R. W. Dutton, G. Dennert, J. W. Uhr, and E. S. Vitetta. 1981.

Induction of B cell differentiation by T cell factors.
I. Stimulation of IgM secretion by products of a T cell hybridoma and a T cell line.

J. Immunology 127: 1953.

Pure, E., P. C. Isakson, J. W. Kappler, P. Marrack, P. H. Krammer, and E. S. Vitetta. 1983.

T cell-derived B cell growth and differentiation factor.
Dichotomy between the responsiveness of B cells from adult and neonatal mice.

J. Exp. Med. 157: 600.

Ralph, P., and T. Kishimoto. 1982.

Tumor promotor Phorbol Myristic Acetate is a T-cell-dependent inducer of immunoglobulin secretion in human lymphocytes.
Clinical Immunology and Immunopathology 22: 340 - 348.

Ralph, P., K. Welte, E. Levi, I. Nakoinz, P. B. Litcofsky, R. H. Mertelsmann, and M. A. S. Moore. 1984.

Human B cell-inducing factor(s) for production of IgM, IgG and IgA: independence from IL2.

J. Immunol. 132: 1858.

Reinherz, E. L., R. Geha, M. E. Wohl, C. Morimoto, F. S. Rosen, and S. F. Schlossman. 1981.

Immunodeficiency associated with loss of T4+ inducer T-cell function.

N. Engl. J. Med. 304: 811.

Reinherz, E. L., P. C. Kung, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1979.

Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody.

Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4061.

Rich, R.-R., and C. W. Piera. 1974.

Biological expressions of lymphocyte activation.

III. Suppression of plaque forming cell responses in vitro by supernatant fluids from concanavalin A-activated spleen cell cultures.

J. Immunol. 112: 1360.

Ringden, O., and B. Rynnell-Dagoo. 1978.

Activation of human B- and T-lymphocytes by protein A of staphylococcus aureus.

Eur. J. Immunol. 8: 47.

Ringden, O., U. Persson, and S. G. O. Johansson. 1983.

Are increased IgE-levels a signal of an acute graft-versus-host reaktion?

Immunological Rev. 71: 57.

Romagnani, S., E. Maggi, G. F. Del Prete R. Troncone, and M. Ricci. 1980.

In vitro production of IgE by human peripheral blood mononuclear cells. I. Rate of IgE biosynthesis.

Clin. exp. Immunol. 42: 167.

Romagnani, S., M. G. Giudizi, R. Biagiotti, F. Almerigogna, E. Maggi, G. Del Prete, and M. Ricci. 1981.

Surface immunoglobulins are involved in the interaction of protein A with human B cells and in the triggering of B cell proliferation induced by protein A-containing Staphylococcus aureus.

J. Immunol. 127: 1307.

Rosenberg, S. A., and P. E. Lipsky. 1981.

The role of monocytes in pokeweed mitogen-stimulated human B cell activation: separate requirements for intact monocytes and a soluble monocyte factor.

J. Immunol. 126: 1341.

Rosenberg, S. A., E. A. Grimm, M. McGrogan, M. Doyle,
E. Kawasaki, K. Kothe, and D. F. Mark. 1984.
Biological activity of recombinant interleukin-2 produced
in E.-coli.
Science 223: 1412.

Saiki, O., and P. Ralph. 1981.
Induction of human immunoglobulin secretion.
I. Synergistic effect of B cell mitogen Cowan plus T cell
mitogens or factors.
J. Immunol. 127: 1044.

Sampson, H. A., and H. R. Buchley. 1981.
Human IgE synthesis in vitro: a reassessment.
J. Immunol. 127: 829.

Saryan, J. A., D. Y. M. Leung, and R. S. Geha. 1983.
Induction of human IgE Synthesis by a factor derived from
T cells of patients with hyper-IgE states.
J. Immunology 130: 242.

Saxon, A., M. Kaplan, and R. H. Stevens. 1980.
Isotype-specific human B lymphocytes that produce immuno-
globulin E in vitro when stimulated by pokeweed mitogen.
J. Allergy Clin. Immunol. 66: 233.

Saxon, A., J. Feldhaus, and R. A. Robins. 1976.
Single step separation of human T and B cells using AET
treated SRBC rosettes.
J. Immunol. Methods. 12: 285.

Schimpl, A., and E. Wecker. 1972.
Replacement of a T cell function by a T cell product.
Nature 237: 15.

Schnaper, H. W., T. M. Aune, and C. W. Pierce. 1983.
Suppressor T cell activation by human leukocyte interferon.
J. Immunol. 131: 2301.

Schreiner, G. F., and E. R. Unanue. 1976.
Membrane and cytoplasmic changes in B lymphocytes induced
by ligand surface immunoglobulin interactions.
Adv. Immunol. 24: 38.

Sher, A., R. Correa-Oliveira, S. Hieny and R. Hussain. 1983.
Mechanisms of protective immunity against schistosoma mansoni
infection in mice vaccinated with irradiated cercariae.
IV. Analysis of the role of IgE antibodies and mast cells.
J. Immunol. 131: 1460.

Shou, L., S. A. Schwartz, and R. A. Good. 1976.
Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of
lymphocytes from normal donors.
J. Exp. Med. 143: 1100.

Siegal, F. P., and M. Siegal. 1977.
Enhancement of irradiated T cells of human plasma cell
production: dissection of helper and suppressor functions
in vitro.
J. Immunol. 118: 642.

Spiegelberg, H. L., J. M. Plummer, J. Ruedi, L. F. Thompson,
M. H. Mellou, and R. S. Zeiger. 1983.
Lack of pokeweed mitogen-induced IgE formation in vitro by
human peripheral blood mononuclear cells: detection of cross-
reacting idiotype determinants on polyclonal Ig by anti-
bodies to a single IgE myeloma protein.
J. Immunol. 131: 3001.

Stevens, R. H. 1982.

Regulation of human B-lymphocyte function in secondary humoral immune responses.

Imm. Today 3: 145.

Swain, S. L., G. Dennert, J. F. Warner, and R. W. Dutton. 1981.

Culture supernatants of a stimulated T cell line have helper activity that acts synergistically with interleukin 2 in the response of B cells to antigen.

Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 2517.

Swain, S. L., and R. W. Dutton. 1982.

Production of a B cell growth-promoting activity, (DL) BCGF, from a cloned T cell line and its assay on the BCL₁ B cell tumor.

J. Exp. Med. 156: 1821.

Takatsu, K., K. Tanaka, A. Tonimaga, Y. Kumahara, and T. Hamaoka. 1980.

Antigen-induced T cell-replacing factor.

III. Establishment of T cell hybrid clone continuously producing TRF and functional analysis of release TRF.

J. Immunol. 125: 2647.

Taniguchi, T., H. Matsui, T. Fujita, C. Takaoka, N. Kashima, R. Yoshimoto, and J. Hamuro. 1983.

Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin 2.

Nature 302: 305.

Thomas, Y., J. Sosman, and O. Irigoyen. 1980.

Functional analysis of human T cell subset defined by monoclonal antibodies.

I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B cell differentiation.

J. Immunol. 125: 2402.

Thomas, Y., L. Rogozinski, O. Irigoyen, S. M. Friedman, P. C. Kung, G. Goldstein, and L. Chess. 1981.

Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies.

V. Suppressor cells within the OKT4+ population.

J. Exp. Med. 154: 459.

Tijo, A. H., W. M. Hull, and G. J. Gleich. 1979.

Production of human immunoglobulin E antibody in vitro.

J. Immunol. 122: 2131.

Tsokos, G. C., and J. E. Balow. 1981.

Suppressor cells generated from human peripheral mononuclear cells by stimulation with pokeweed mitogen.

Cell. Immunol 65: 221.

Turner, K. J., B. J. Holt, and P. G. Holt. 1981.

In vitro synthesis of IgE by human peripheral blood leucocytes: relationship to serum titre of leucocyte donor.

Clin. Exp. Immunol. 43: 458.

Urbaniak, S. J., A. G. White, G. R. Barclay, S. M. Wood, and A. B. Kay. 1978.

Tests of immune function.

in: Handbook of experimental immunology

ed: Weir, D. M., chapter 47, Blackwell, London.

Voshaar, T., K. M. Hess, B. Rasche, H. Thiel, W. T. Ulmer, W. Heyden, H. Fabry, and W. König. 1982.

Studies on human Ig (M, G, A, E) synthesis in vitro from peripheral lymphocytes in patients with flour allergy and pollinosis.

Immunobiology 162: 436.

Waldmann, T. A., S. H. Polmar, S. T. Balestra, M. C. Jost, R. M. Bruce, and W. D. Terry. 1972.

Immunoglobulin E in immunologic deficiency diseases.

II. Serum IgE concentration of patients with acquired hypogammaglobulinemia, thymoma and hypogammaglobulinemia myotonic dystrophy, intestinal lymphangiectasia and Wiskott-Aldrich Syndrome.

J. Immunol. 109: 304.

Wells, J. V. 1980.

Immunoglobulins: biosynthesis and metabolism.

in: Basic and clinical immunology, 3rd edition.

ed.: H. H. Fudenberg, D. P. Stites, J. L. Caldwell and J. V. Wells.

Lange Medical Publications, Los Altos, California.

Wetzel, G. D., and J. R. Kettmann. 1981.

Activation of murine B lymphocytes.

III. Stimulation of B lymphocyte clonal growth with lipopolysaccharide and dextran sulfate.

J. Immunol. 126: 723.

Wetzel, G. D., S. L. Swain, and R. W. Dutton. 1982.

A monoclonal T cell-replacing activity can act directly on B cells to enhance clonal expansion.

J. Exp. Med. 156: 306.

Willcox, H. N. A., and D. G. Marsh. 1978.

Genetic regulation of antibody heterogeneity: its possible significance in human allergy.

Immunogenetics 6: 209.

Wrigley, D. M., and Y. S. Choi. 1983.

Characterization of the subpopulations of human peripheral blood B lymphocytes which react to Staphylococcus aureus Co wan I and T-cell help.
Cell. Immunol. 78: 130.

Yachie, A. T. Miyawaki, T. Yokoi, T. Nagaoki, and N. Taniguchi. 1982.

Ia-positive cells generated by PWM-stimulation within OKT4+ subset interact with OKT8+ cells for inducing active suppression on B cell differentiation in vitro.
J. Immunol. 129: 103.

Yaoita, Y., Y. Kumagai, K. Okumura, and T. Honjo. 1982.

Expression of lymphocyte surface IgE does not require switch rekombination.
Nature 297: 697.

Yoshizaki, K., T. Nahagawa, T. Kaieda, A. Muraguchi, Y. Yamanura, and T. Kishimoto. 1982.

Induction of proliferation and Ig-production in human B leukemic cells by anti-immuno-globulins and T cell factors.
J. Immunology 128: 1296.

Zubler, R. H., and O. Kanagawa. 1982.

Requirement for three signals in B cell responses.
II. Analysis of antigen- and Ia-restricted T helper cell-B cell interaction.
J. Exp. Med. 156: 415.

Zuraw, B. L., M. Nonaka, C. O'Hair, and D. H. Katz. 1981.

Human IgE antibody synthesis in vitro: stimulation of IgE responses by pokeweed mitogen and selective inhibition of such responses by human suppressive factor of allergy (SFA).
J. Immunol. 127: 1169.

Addendum

Ballieux, R. E., and C. J. Heijnen. 1983.

Immunoregulatory T cell subpopulations in man: dissection by monoclonal antibodies and Fc-receptors.

Imm. Rev. 74: 5.

Gatenby, P. A., G. S. Kansas, C. Y. Xion, R. L. Evans, and E. G. Engleman. 1982.

Dissection of immunoregulatory subpopulations of T lymphocytes within the helper and suppressor sublineages in man.

J. Immunol. 129: 1997.

Hemady, Z., F. Blomberg, S. Gellis, and R. E. Rocklin. 1983.

IgE production in vitro by human blood mononuclear cells: a comparison between atopic and nonatopic subjects.

J. Allergy Clin. Immunol. 71: 324.

Hess, K. M., W. Heyden, H. Fabry, K. Kallweit, H. Thiel, W. T. Ulmer, and W. König. 1983.

Modulation of spontaneous and PWM induced IgE-synthesis in patients with seasonal pollinosis.

Immunobiology 165: 278.

Hirano, T., Y. Kumagai, K. Okumura, and Z. Ovary. 1983.

Regulation of murine IgE production: importance of a not-yet-described T cell for IgE secretion demonstrated in SJA9 mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 3435.

Hirano, T., T. Teranishi, B. H. Lin, and K. Onoue. 1984.

Human helper T cell factor(s).

IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on Staphylococcus aureus Cowan I-stimulated B cells.

J. Immunol. 133: 798.

Holt, P. G., K. J. Turner, and B. J. Holt. 1981.
In vitro synthesis of IgE by human peripheral blood leucocytes.
II. Modulation of IgE B cell activity by isotypespecific
regulatory T cells.
Clin. Exp. Immunol. 45: 523.

Howard, M., J. Farrar, M. Hilfiker, B. Johnson, K. Takatsu,
T. Hamaoka, and W. E. Paul. 1982.
Identification of a T cell derived B-cell growth factor
distinct from interleukin 2.
J. Exp. Med. 155: 914.

Humphrey, J. H., D. M. V. Parrot, and J. East. 1964.
Studies on globulin and antibody production in mice
thymectomized at birth.
Immunology 7: 419.

Hunter, W. M., and F. C. Greenwood. 1962.
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of
high specific activity.
Nature 194: 485.

Morimoto, C., E. L. Reinherz, Y. Borel, and S. F. Schlossman.
1983.
Direct demonstration of the human suppressor inducer subset
by anti-T cell antibodies.
J. Immunol. 130: 157.

Reinherz, E. L., C. Morimoto, K. A. Fitzgerald, R. E. Hussey,
J. A. Daley, and S. F. Schlossman. 1982.
Heterogeneity of human T4+ inducer T cells as defined by a
monoclonal antibody that delineates two functional
subpopulations.
J. Immunol. 128: 463.

L e b e n s l a u f

- 23.07.52 geboren in Lübeck als Sohn von
Ulrich und Elfriede Szperalski
- April 1959 eingeschult in Lübeck
- Mai 1963 Besuch des C.-J.-Burckhardt-Gymnasiums
in Lübeck
- Mai 1971 Abitur am mathematisch-naturwissen-
schaftlichen Zweig
- Oktober 1971 Beginn des Biologiestudiums an der
Christian-Albrechts-Universität in Kiel;
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Chemie,
Biochemie, Botanik, Limnologie
- Dezember 1976 Diplomprüfung mit dem Hauptfach Mikrobiologie
und den Nebenfächern Biochemie und Botanik
- Januar 1977 Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikro-
biologie unter der Leitung von Prof. P. Hirsch
"Die natürliche Verbreitung von Hyphomicrobium
spp."
- Januar 1978 Abschluß des Diploms
- April 1978 bis Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter
Juni 1980 an der Hautklinik der Universität Kiel unter
der Leitung von Prof. E. Christophers;
Untersuchung der Granulozytenfunktionen von
Psoriasis-Patienten
- Oktober 1980 Beginn der Promotionsarbeit in der Arbeits-
gruppe für Infektabwehrmechanismen unter der
Leitung von Prof. W. König, am Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
der Ruhr-Universität Bochum (Direktor
Prof. W. Opferkuch)
- Oktober 1984 Antrag auf Zulassung zur Promotion

